



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANNA CLARA GREGÓRIO CÓ

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Bcl-2 COMO POTENCIAL
BIOMARCADOR DE PROGRESSÃO TUMORAL EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL**

VITÓRIA, ES

2019

ANNA CLARA GREGÓRIO CÓ

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Bcl-2 COMO POTENCIAL
BIOMARCADOR DE PROGRESSÃO TUMORAL EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Ventorin
von Zeidler

VITÓRIA
2019

DEDICATÓRIA

Não lembro exatamente quando tomei gosto pela pesquisa, acho que está em mim desde pequena essa curiosidade e vontade de entender como o mundo funciona. Ao entrar na Universidade e me deparar com as inúmeras possibilidades, me encontrei dentro de um laboratório de patologia molecular, sendo orientada por uma mulher que é exemplo de dedicação, seriedade, trabalho e confiança, ensinando aos alunos que o avanço da ciência só se desenvolve se houver cooperação, sem arrogância que muitos apresentam na academia. Logo, dedico este trabalho a minha orientadora, Professora Sandra Zeidler, que me ensinou, nessa jornada a gostar ainda mais do que eu escolhi fazer.

Não posso deixar de dedicar a dissertação e agradecer aos meus colegas de laboratório, Priscila, Isabella, Thabata, Paola, Jéssica, Willene, Camila, Pâmela, Gabi, Regina, Vinícius, Amanda e aos alunos de IC, que no final das contas viraram minha família, pois compartilhamos risos, desesperos, debates sobre estatística e muitos ATPs queimados discutindo resultados e possíveis projetos futuros. Nos frustamos quando os experimentos não funcionaram, nos realizamos quando dava certo e continuamos a caminhada juntos ou em outros estados, para contribuir com o desenvolvimento científico do nosso mundo.

Não posso deixar de dedicar essa vitória a meus pais, meus irmãos, minha família e amigos, que sempre compreenderam as minhas ausências, meu cansaço, minhas reclamações e felicidades. Sem o apoio de todos eu jamais conseguiria!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, ao Hospital Santa Rita de Cássia, ao Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes, ao corpo clínico que permitiu a realização do acompanhamento às consultas dos pacientes. Agradecemos também a colaboração do professor Hisham Mehanna diretor do Institute of Head and Neck Studies and Education da University of Birmingham, Reino Unido.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), processo número 0418/2015, por fomentar e viabilizar a execução desta pesquisa.

EPÍGRAFE

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.” (Eduardo Galeano)

Có, A.C.G. **Expressão da proteína Bcl-2 como potencial biomarcador de progressão tumoral em carcinoma epidermóide oral.** 2019. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

RESUMO

O carcinoma epidermóide oral (CEO) é o tipo histológico mais comum do câncer da cavidade oral e apresenta elevada taxa de mortalidade, cerca de 50% dos indivíduos diagnosticados com CEO evoluem ao óbito dentro de um período de até 5 anos. Atualmente não existem biomarcadores capazes de prever o prognóstico e a progressão tumoral, logo o estudo de proteínas responsáveis pelo controle apoptótico e, portanto, envolvidas na carcinogênese, tem estado em evidência. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar a expressão da proteína Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein*) como biomarcador de prognóstico e progressão tumoral em CEO. Utilizamos, para isso, dados clínicos e de seguimento de 109 indivíduos com diagnóstico conclusivo de CEO. Análise histopatológica de gradação, padrão de invasão, infiltrado linfocitário, invasão perineural, vascular e linfática tumoral foram avaliadas em lâminas coradas em Hematoxilina e Eosina. Fragmentos de tecido tumoral, displasia e epitélio adjacente ao tumor foram dispostos em microarranjos teciduais e submetidos à imuno-histoquímica, utilizando anticorpo anti-Bcl-2, clone 124. Elevada expressão de Bcl-2 foi observada no tecido tumoral, em relação ao epitélio adjacente ao tumor e displasia ($p=0,033$), bem como no fronte de invasão tumoral associado ao alto grau de infiltrado linfocitário tumoral ($p=0,001$). Não foi observada diferença entre a expressão de Bcl-2 em tecido tumoral quando comparada às variáveis clínico-patológicas: tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, estadiamento, idade, sexo, consumo de álcool e tabaco. Adicionalmente, a expressão de Bcl-2 não foi associada ao prognóstico nas análises de sobrevida global e livre de doença. Concluímos que a proteína Bcl-2 pode ter papel importante em indicar o potencial de transformação maligna do epitélio oral no modelo de progressão tumoral utilizado, podendo ser um potencial biomarcador de evolução da displasia de alto grau para o CEO. No entanto, neste estudo, a expressão de Bcl-2 não mostrou ser um bom biomarcador de prognóstico.

Palavras-Chave: Bcl-2, carcinoma epidermóide oral, câncer da cavidade oral, biomarcador.

EXPRESSION OF Bcl-2 PROTEIN AS A POTENTIAL BIOMARKER OF TUMOR PROGRESSION IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common histological type of cancer of the oral cavity and presents a high mortality rate, about 50% of individuals diagnosed with OSCC evolve to death within a period of up to 5 years. Currently, there are no biomarkers able to predict prognosis and tumor progression features, in this way, the study of proteins responsible for apoptotic control and therefore involved in carcinogenesis has been in evidence. Thus, this study aims to evaluate the expression of Bcl-2 protein (B-cell lymphoma protein 2) as a prognostic biomarker and tumor progression in OSCC. We used clinical and follow-up data from 109 individuals with a conclusive diagnosis of OSCC. Histopathological analysis of gradation, pattern of invasion, tumor lymphocytic infiltrate, perineural, vascular and lymphatic tumor invasion were evaluated on stained slides in Hematoxylin and Eosin. Fragments of tumor tissue, dysplasia and adjacent epithelium to the tumor were arranged in tissue microarrays and submitted to immunohistochemistry using anti-Bcl-2 antibody, clone 124. High Bcl-2 expression was observed in the tumor tissue, in relation to the adjacent epithelium to the tumor and dysplasia ($p = 0.033$), as well as on the tumor invasion front associated with the high degree of tumor lymphocytic infiltrate ($p = 0.001$). No difference was observed in Bcl-2 expression in tumor tissue when compared to clinical-pathological variables: tumor size, lymph node involvement, staging, age, gender, alcohol consumption and smoking. Additionally, Bcl-2 expression was not associated with prognosis in global and disease-free survival analyzes. We conclude that Bcl-2 protein may play an important role in indicating the malignant transformation potential of the oral epithelium in the tumor progression model used and may be a potential biomarker for the evolution of high-grade dysplasia for the CEO. However, in this study, Bcl-2 expression did not prove to be a good prognostic biomarker.

Key words: Bcl-2, oral squamous cell carcinoma, oral cavity cancer, biomarker.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativa do número de casos incidentes e mortalidade de câncer no mundo. Adaptado de GLOBOCAN (2018).....	18
Figura 2. Incidência do câncer da cavidade oral no Brasil, por sexo. Adaptado de INCA (2018).	19
Figura 3. Alterações histopatológicas do epitélio oral na transformação maligna, adaptada de FORASTIERE e colaboradores (2001).....	20
Figura 4. Classificação TNM. Adaptado de KASPER e colaboradores (2008).....	22
Figura 5. Esquema mostrando as principais características desenvolvidas por uma célula cancerosa. Adaptado de Sasahira e colaboradores (2018).	25
Figura 6. Representação esquemática das características estruturais das proteínas Bcl-2 pró-apoptóticas e anti-apoptóticas.Figura adaptada de BURLACU (2003).....	26
Figura 7. Representação das vias apoptóticas intrínseca e extrínseca.....	27
Figura 8. Fotomicrografia representativa da gradação tumoral em CEO	42
Figura 9. Fotomicrografia do Infiltrado linfocitário tumoral em CEO	43
Figura 10. Fotomicrografia de CEO representando o padrão de invasão tumoral conforme proposto por Bryne et al., 1992.....	44
Figura 11. Fotomicrografia dos diferentes tipos de invasão tumoral	44
Figura 12. Expressão da proteína Bcl-2 nos segmentos de epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor.	48
Figura 13. Imunomarcação de Bcl-2 nos segmentos epitélio adjacente ao tumor, displasia e CEO.....	49
Figura 14. Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida global em relação à expressão de Bcl-2.	50
Figura 15. Curva de sobrevida livre de doença em relação à expressão de Bcl-2 pelo método Kaplan-Meier e log-rank.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínico-patológicas dos indivíduos com CEO (n=109).....	41
Tabela 2. Associação entre as características clínico-patológicas dos indivíduos acometidos por CEO e a expressão da proteína Bcl-2	46
Tabela 3. Associação entre as variáveis histopatológicas e a expressão da proteína Bcl-2 no tecido tumoral.....	47
Tabela 4. Padrão de expressão de Bcl-2 na progressão tumoral (n=28).....	48
Tabela 5. Associação entre expressão de Bcl-2 e o grau de displasia (n=44)	49

LISTA DE ABREVIações

Apaf-1	Fator de ativação de apoptose 1
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2
CEO	Carcinoma epidermóide oral
CID	Classificação internacional de doenças
DAB	3.3'-Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fas	receptor TNF
FasL	Ligante Fas
HE	Hematoxilina-eosina
HPV	Human Papilomavirus
HUCAM	Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes
HSRC	Hospital Santa Rita de Cássia
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IHQ	Imunohistoquímica
SLD	Sobrevida livre de doença
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N+	Presença de metástase em linfonodos regionais
SG	Sobrevida global
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão

T4	Tumor que invade estruturas adjacentes
TIL	Linfócitos T infiltrantes
TMA	Microarranjo tecidual, do inglês <i>Tissue Microarray</i>
TMN	<i>Tumor Node Metastasis</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAIL	Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL	18
2.1.1	Histopatologia	19
2.1.2	Classificação	21
2.1.3	Fatores de risco	23
2.1.4	Resistência à morte celular	24
2.2	BCL-2	26
2.3	BCL-2 E O CÂNCER	28
2.4	INDICADORES DE PROGNÓSTICO EM CEO	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	AMOSTRAS E MÉTODOS	32
4.1	ASPÉCTOS ÉTICOS	32
4.2	CASUÍSTICA	32
4.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	33
4.4	MICROARRANJO TECIDUAL	35
4.4.1	Validação TMA	36
4.5	IMUNOHISTOQUÍMICA	36
4.5.1	Imunohistoquímica da proteína Bcl-2	36
4.5.2	Análise de expressão proteica	37
4.6	ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES	38
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5	RESULTADOS	40
5.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	40
5.2	EXPRESSÃO DE BCL-2	45

5.3	ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA.....	50
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÃO	56
8	BIBLIOGRAFIA.....	57
9	APÊNDICES	61

1 INTRODUÇÃO

De acordo com dados publicados pela International Agency for Research on Cancer (IARC), um em cada cinco homens e uma a cada seis mulheres irão desenvolver algum tipo de câncer no decorrer de suas vidas, no mundo. Essa estimativa reflete no quanto é relevante o estudo do câncer, a fim de compreender a etiologia, desenvolvimento e comportamento da doença. Com isso, é possível desenvolver medidas de prevenção, detecção precoce, diagnóstico e tratamento eficientes, garantindo uma melhor qualidade de vida para estes pacientes (GLOBOCAN, 2018).

O câncer da cavidade oral acomete predominantemente o assoalho de boca e língua, mas também pode ocorrer em outros subsítios como a mucosa labial, mucosa bucal, o palato duro, área retromolar e gengiva, como pode ser observado na figura 1 (CHI, ANGELA C.; DAY, TERRY A.; NEVILLE, 2015). O tipo histológico mais frequente é o carcinoma epidermóide oral (CEO), que origina-se a partir do epitélio de revestimento, na maioria das vezes associado à exposição aos fatores de risco álcool e tabaco (BRENER et al., 2007; MONTERO; PATEL, 2016).

Atualmente, o diagnóstico do CEO é realizado por análise histopatológica. As características clínicas, como tamanho tumoral, acometimento linfonodal e localização das lesões são fundamentais para, juntamente com o diagnóstico anatomo-patológico, orientar a conduta médica para definir o melhor tratamento para o indivíduo (MONTERO; PATEL, 2016; RIVERA; VENEGAS, 2014).

Quando o câncer é identificado em estádios iniciais, as condições para o tratamento são favoráveis, com maior chance de cura e melhor sobrevida do paciente, podendo ainda trazer menos sequelas e menor custo (SINEVICI; O'SULLIVAN, 2016). No entanto, no Brasil, a maior parte dos casos é diagnosticada em estadios avançados da doença, o que impacta na redução da sobrevida, que desses tumores já é reduzida, em torno de 5 anos (INCA, 2015; SHRIDHAR et al., 2016).

Apesar dos avanços nas pesquisas em busca de tratamentos mais efetivos e compreensão das alterações moleculares no campo da oncologia e cirurgia, as taxas

de morbimortalidade permanecem altas. Um dos fatores que explica estes números é a ausência de biomarcadores que auxiliem na determinação do prognóstico ou capazes de prever a evolução destes tumores (BROCKLEHURST; BAKER; SPEIGHT, 2010). Como consequência, a busca por biomarcadores de prognóstico e progressão tumoral tem ganhado destaque nos últimos anos, com grande potencial para a descoberta de biomarcadores capazes de estratificar os casos e assim, permitirem que a equipe médica defina sobre tratamentos mais individualizados (COUTINHO-CAMILLO et al., 2010).

Sabe-se que a carcinogênese oral está relacionada com o acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas em processos cruciais de regulação do ciclo celular, como por exemplo a apoptose (SASAHIRA, TOMONORI; KIRITA, 2018). A família de proteínas Bcl-2 participa desse processo de tumorigênese, uma vez que regulam as interações que ditam a sobrevivência celular ou comprometem a célula a processos apoptóticos (CHIPUK et al., 2010). Estudos prévios têm mostrado que a elevada expressão da proteína Bcl-2 está relacionada a um prognóstico ruim em diversos tipos de câncer (ANVARI et al., 2012; KIRKIN; JOOS; ZÖRNIG, 2004; PAVITHRA et al., 2017, THOMAS et al., 2013). No entanto os estudos são controversos quanto a expressão de Bcl-2 e o CEO.

Assim, neste estudo, nos propusemos a avaliar a aplicabilidade da proteína Bcl-2, membro anti-apoptótico da família de proteínas Bcl-2, como biomarcador de prognóstico e progressão tumoral em CEO, em um modelo de progressão tumoral com segmentos de epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor, como possível facilitador da decisão terapêutica, impactando na qualidade de vida dos indivíduos acometidos por esses tumores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL

O câncer da cavidade oral é o 16º tipo de câncer mais incidente no mundo (GLOBOCAN,2018), apresentando elevada taxa de mortalidade, cerca de 50%, em um período de 5 anos, que é o tempo de sobrevida médio de um indivíduo diagnosticado com câncer nesse sítio anatômico (SASAHIRA, TOMONORI; KIRITA, 2018), como pode ser observado na Figura 1, abaixo.

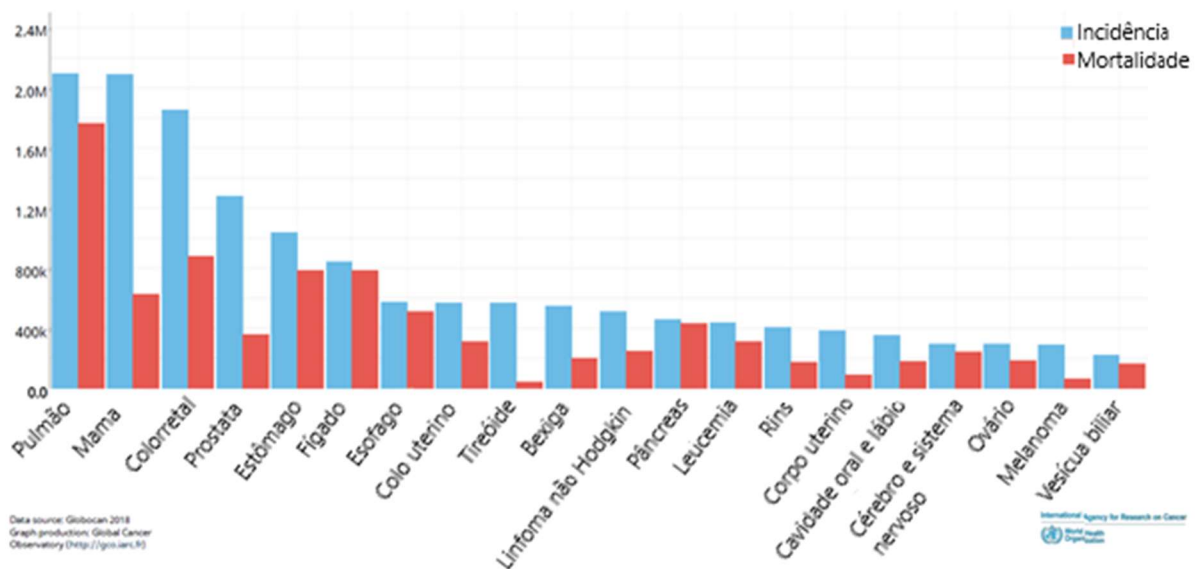


Figura 1. Estimativa do número de casos incidentes e mortalidade de câncer no mundo. Adaptado de GLOBOCAN (2018).

No Brasil, estima-se cerca de 15.000 novos casos de câncer da cavidade oral entre 2018 e 2019, afetando 11 a cada 100 mil homens e 3 a cada 100 mil mulheres, sendo classificado como o quinto tipo mais comum de câncer entre os homens e o décimo segundo tipo de câncer mais comum no sexo feminino. O Espírito Santo é o estado brasileiro com a maior incidência da doença, com a taxa aproximada de 14,58 casos a cada 100 mil homens e 4,01 casos a cada 100 mil mulheres, como pode ser observado na Figura 2 (INCA, 2018).

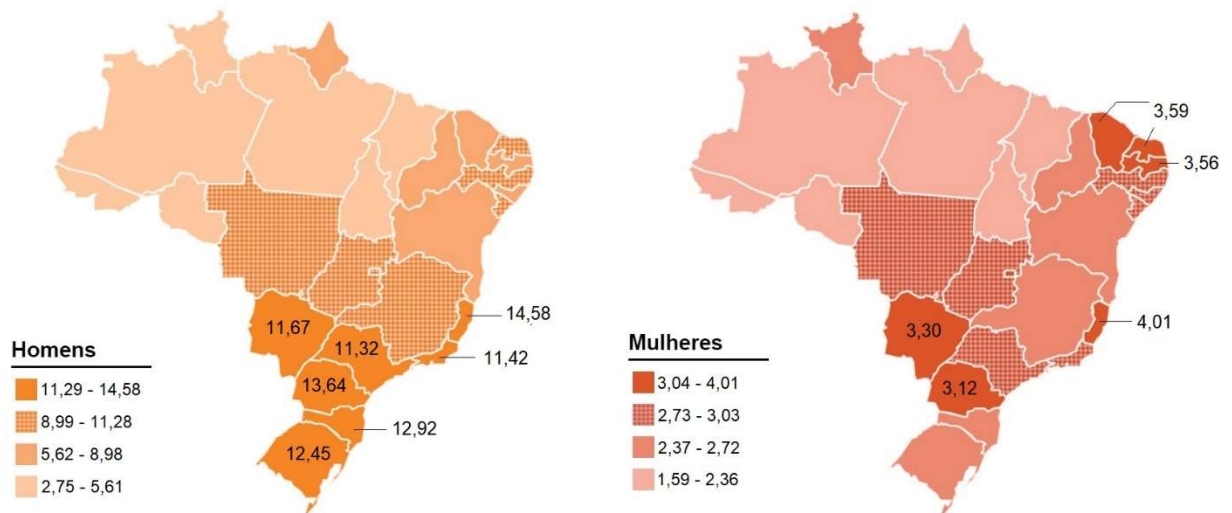


Figura 2. Incidência do câncer da cavidade oral no Brasil, por sexo. O estado do Espírito Santo é o estado com maior incidência de câncer bucal no país, seguido de Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Rio de Janeiro, em relação aos homens. Entre as mulheres, também segue a liderança, seguido de Ceará, Pernambuco e Piauí, Mato Grosso do Sul e Santa Catarina. Adaptado de INCA (2018).

2.1.1 Histopatologia

O tipo histológico de câncer mais comum na cavidade oral é o carcinoma epidermóide, derivado do epitélio escamoso estratificado da mucosa oral, responsável por cerca de 90% do câncer da cavidade oral. Apesar dos avanços no tratamento, como a cirurgia robótica e os avanços na radioterapia e quimioterapia, a sobrevida se mantém a mesma há cerca de três décadas, não havendo melhoras significativas (MONTERO; PATEL, 2016; SASAHIRA, TOMONORI; KIRITA, 2018). Este quadro é em parte explicado pelo diagnóstico tardio da doença em mais de 72% dos casos. Logo, a detecção precoce do câncer favorece um melhor desfecho clínico, uma vez que em estádios iniciais, há possibilidade de melhor resposta ao tratamento e reduzida morbidade.

Um dos desafios da detecção precoce do CEO está relacionado à dificuldade de identificar quando tecidos displásicos da cavidade oral sofrerão transformação maligna, pois não há indicadores precisos dessa transição. As alterações da cavidade oral ocorrem em etapas, as quais são marcadas por alterações morfológicas, funcionais, genéticas e epigenéticas nas células. Essas mudanças caracterizam o fenômeno conhecido como transição epitélio-mesenquimal, onde de células com fenótipo epitelial passam a expressar características fenotípicas de células

mesenquimais, adquirindo além de morfologia compatível, outras características como perda de polaridade celular, com rearranjo nuclear, perda das estruturas de adesão, manifestando assim, maior mobilidade, capacidade de invasão e perdendo suas estruturas de adesão, contribuindo para a transformação do carcinoma epidermóide propriamente dito (MONTERO; PATEL, 2016; CHAW et al., 2012).

Analizando as características morfológicas do epitélio durante o processo de carcinogênese, é possível identificar alterações como hiperqueratose e hiperplasia. Com o avanço da progressão das mudanças epiteliais, também é possível identificar os vários graus de displasia, variando desde leve, moderada e severa, até o carcinoma *in situ*, ou seja, displasia de alto grau, que antecede o estabelecimento do carcinoma microinvasor (KUJAN et al., 2006; RIVERA; VENEGAS, 2014).

Alguns modelos são utilizados para exemplificar a progressão de um epitélio normal a um epitélio displásico, como ilustrado na figura 3. Quando as células atípicas destroem a membrana basal e invadem o conjuntivo subjacente, tem-se a formação do carcinoma microinvasor, o qual pode posteriormente originar células capazes de invadir os tecidos adjacentes e até mesmo causar metástases regionais ou à distância (CHI, ANGELA C.; DAY, TERRY A.; NEVILLE, 2015; RIVERA; VENEGAS, 2014).

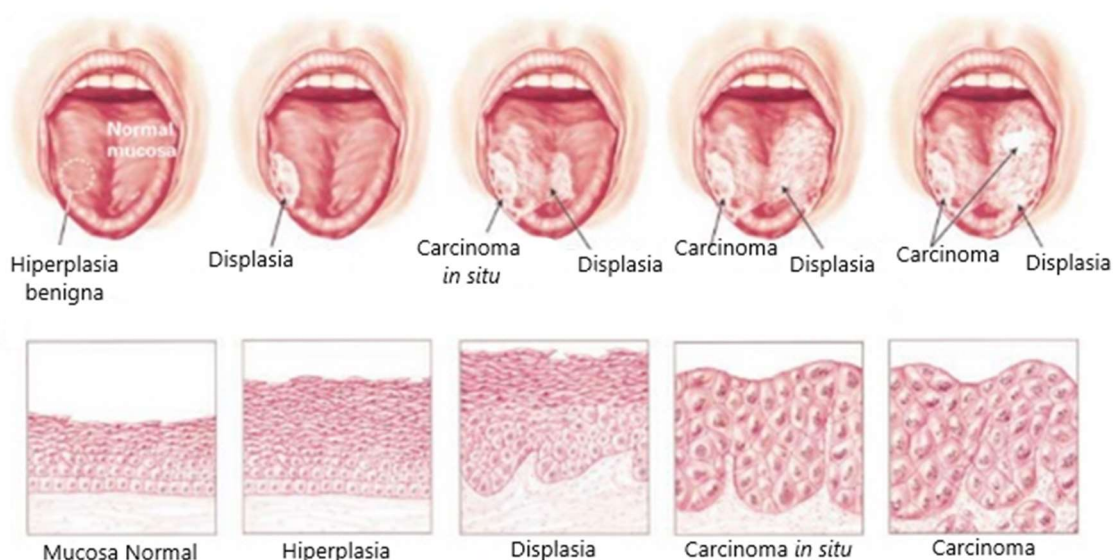


Figura 3. Alterações histopatológicas do epitélio oral na transformação maligna, adaptada de FORASTIERE e colaboradores (2001).

2.1.2 Classificação

Para avaliar as diferenças observadas na histopatologia tumoral, várias classificações têm sido propostas por estudiosos e também pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Em 2005, a OMS propôs a classificação internacional de tumores, com base no grau de diferenciação tumoral, dividindo os tumores em bem diferenciados, moderadamente diferenciados e indiferenciados, o que foi proposto para auxiliar na avaliação da taxa de crescimento tumoral e na capacidade metastática do tumor.

O *Royal College of Pathologists* (Liverpool), também sugere classificar os tumores de acordo com o padrão de invasão tumoral, considerando o fronte de invasão (HELLIWELL, TIM ; WOOLGAR, 2013). O fronte de invasão tumoral é a área do tumor que avança em relação aos tecidos adjacentes, sendo considerada por alguns autores como sendo a área mais representativa do tumor, caracterizada pelas modificações mais avançadas no grau de queratinização, polimorfismo celular e nuclear, e capacidade de invasão (RIVERA; VENEGAS, 2014).

Clinicamente, o CEO é classificado de acordo com o Sistema de estadiamento preconizado pelo *The American Joint Committee on Cancer* (AJCC), conhecido como Sistema TNM de classificação de tumores malignos, o qual considera a extensão da doença e a localização anatômica do tumor.

O estadiamento é utilizado para determinar o tratamento adequado do tumor, levando em conta o tamanho do tumor primário (T), profundidade de invasão (Depth of invasion, DOI) medido em milímetros, o comprometimento dos linfonodos regionais (N), que estão presentes na cadeia de drenagem linfática relacionada à região em que o tumor primário está localizado, levando em consideração a extensão extranodal (Extranodal extension, ENE) e na presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem subclassificações numéricas (T0 a T4; N0 a N3; M0 a M1, ENE +/-) que, quando relacionados, indicam a extensão da doença e o grau de disseminação do tumor (AJCC,2017). Este sistema também é útil para avaliar o prognóstico do indivíduo após tratamento.

Após a identificação das categorias T, N e M, estas são agrupadas para formar o

estadiamento clínico, o qual pode variar de I a IV. Nos estádios I e II, os tumores são, respectivamente, T1 e T2, não apresentam metástase em linfonodos regionais (N0) e nem à distância (M0). Os tumores T3 ou aqueles T1 e T2 com um linfonodo regional metastático (N1) são considerados estágio III. Lesões classificadas como T4, ou aquelas que apresentam dois linfonodos regionais acometidos por neoplasias (N2) e todos os tumores que apresentam metástase à distância (M1), são considerados estágio IV (AJCC,2017). Mais detalhes sobre a classificação TNM estão representados na figura 4.

Definição de TNM				Estadiamento		
Estadio 1	T1	T: ≤ 2 cm DOI: ≤ 5 cm	N0		T1	N0 M0
Estadio 2	T2	T: ≤ 2 cm 5 cm < DOI ≤ 10 cm ou 2 cm > T < 4 cm DOI: ≤ 10 mm	N0		T2	N0 M0
Estadio 3	T3	T: > 4 cm DOI: > 10 mm	N1	N: ≤ 3 cm ENE: (-)	T3 T1 T2 T3	N0 M0 N1 M0 N1 M0 N1 M0
Estadio IV	T4a	Invasão de estruturas adjacentes	N2	N: <3cm ENE: (+) ou N: <6 cm ENE: (-)	T4a T4a T1 T2 T3 T4a	N0 M0 N1 M0 N2 M0 N2 M0 N2 M0 N2 M0
Estadio IVB	T4b	Invasão de estruturas adjacentes	N3	N: > 6 cm ENE: (-) ou N: > 3 cm ENE: (+) ou N: bilateral ENE: +	T4b T	N M0 N3 M0

Figura 4. Classificação TNM. A ilustração mostra a classificação anatômica para estadiamento tumoral. A categoria T indica o tamanho do tumor, a categoria N descreve o envolvimento de linfonodos regionais e a categoria M descreve a presença

ou não de metástase à distância. A subclassificação utilizando letras “a” e “b” estão relacionadas a área acometida pelo tumor. O estadiamento IV C não representado na tabela é indicado por qualquer classificação T, N com metástase a distância positiva. Adaptado de KASPER e colaboradores (2008).

A partir do estadiamento clínico do tumor e do resultado histopatológico, é possível determinar qual o melhor tipo de tratamento para o indivíduo. O tratamento de escolha é a cirurgia, mas a quimioterapia e a radioterapia são utilizadas com frequência como tratamentos adjuvantes à cirurgia ou tratamentos paliativos. Apesar do tratamento cirúrgico ser radical, existe um considerável número de recorrências. (ZYGOGIANNI et al., 2011). Sendo assim, é necessária a inclusão de indicadores de prognóstico e do CEO, para auxiliar na conduta médica de tratamento.

2.1.3 Fatores de risco

As transformações celulares que contribuem para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide provêm do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. Alguns fatores de risco já bem conhecidos por estarem associados ao desenvolvimento da doença são o consumo de álcool e uso do tabaco que, de maneira sinérgica, potencializam o efeito cancerígeno (BRENER et al., 2007; PETERSEN, 2009). Homens que consomem bebida alcoólica e fumam estão cerca de trinta e oito vezes mais propensos a desenvolver o câncer que homens que não apresentam exposição a esses carcinógenos (ZYGOGIANNI et al., 2011).

Ainda não existem mecanismos bem elucidados que explicam o efeito carcinógeno do álcool e do tabaco, mas as hipóteses mais aceitas relacionam a desidratação gerada pelo álcool ao aumento da permeabilidade da mucosa oral a outras toxinas e carcinógenos, como os mais de 300 tipos presentes no cigarro e nas folhas de tabaco. Os benzopirenos, nitrosaminas e aminas aromáticas, produtos gerados a partir da queima do tabaco, são capazes de promover alterações no DNA das células epiteliais em replicação. Além disso, o próprio metabolismo do álcool pode contribuir para a carcinogênese, levando à formação do acetaldeído, que é facilmente absorvido pela mucosa e tem potencial de provocar danos no epitélio, podendo levar à malignização dos queratinócitos (KHAIRNAR; WADGAVE; KHAIRNAR, 2017; PEMBERTON, 2018; ZYGOGIANNI et al., 2011).

Infecções virais que interferem no ciclo celular, como infecções pelo Papilomavírus humano (HPV), sobretudo os subtipos 16 e 18, também tem sido apontados como associadas ao desenvolvimento do câncer da cavidade oral (DEGLI ESPOSTI et al., 2017). Contudo, a frequência de infecção pelo HPV em células tumorais de CEO é bastante variável (0 a 90%), dependendo da região geográfica, o que gera dúvidas sobre a real participação do HPV na carcinogênese desses tumores. Recentemente, estudos demonstraram que a frequência de infecção pelo HPV em CEO é baixa no Espírito Santo (DE ABREU et al., 2018), sendo o álcool e o tabaco considerados como os principais fatores envolvidos na carcinogênese destes tumores.

2.1.4 Resistência à morte celular

A progressão tumoral ocorre quando alterações genéticas e epigenéticas são estabelecidas e promovem mudanças moleculares capazes de causar modificações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas nas células, as quais passam a desenvolver características específicas, que culminam na imortalização e autonomia de proliferação celular. Essas características foram agrupadas e descritas por Hanahan e Weinberg (2011), conforme esquematizado na figura 5.

Assim, a célula tumoral passará a apresentar capacidade de sustentar a sinalização proliferativa, evitando a ação dos genes supressores tumorais e a ação do sistema imune. Estas células podem também desenvolver a capacidade de invasão e metástase, promovendo um microambiente de inflamação e induzindo a angiogênese. Adicionalmente, estas células podem apresentar instabilidade e mutação genômica, o que favorece o acúmulo de outras mudanças, podendo inclusive adquirir o fenótipo de imortalidade, resistindo à morte celular e desregulando o metabolismo energético celular.

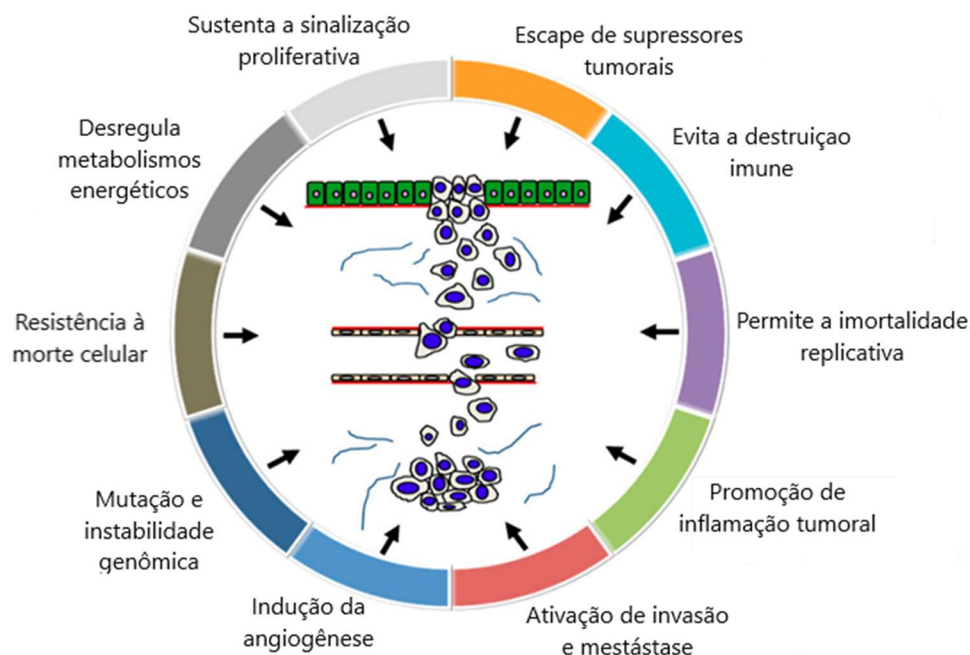


Figura 5. Esquema mostrando as principais características desenvolvidas por uma célula cancerosa. Adaptado de Sasahira e colaboradores (2018).

Uma das características da resistência à morte celular das células cancerosas é a capacidade de escapar dos mecanismos de apoptose. A apoptose consiste na morte celular caracterizada pelas alterações morfológicas de retração citoplasmática, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação cromossômica e formação dos corpos apoptóticos, que são fagocitados por células como os macrófagos e digeridos por enzimas no fagolisossomo, sem gerar qualquer tipo de inflamação (AKL et al., 2014).

A apoptose ocorre basicamente por duas vias distintas, a via extrínseca, ou extracelular e a via intrínseca ou intracelular. Na via extrínseca há ativação de receptores de morte celular, presentes na membrana celular, por ligantes de morte específicos, que aumentam a atividade das caspases 8 e 3, como por exemplo os receptores pertencentes a família dos fatores de necrose tumoral (TNF)/TRAIL e Fas/FasL. A via intrínseca, por sua vez, é regulada pela família das proteínas Bcl-2, que quando estimuladas, participam nos processos de controle de permeabilidade da membrana mitocondrial. Membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 participam da liberação de citocromo C da mitocôndria para o citosol, promovendo assim a ativação das caspases 9 e 3, as quais irão induzir a apoptose. Membros anti-apoptóticos dessa família, atuam impedindo a apoptose, por bloquear a ação de proteínas pró apoptóticas (KIRKIN; JOOS; ZÖRNIG, 2004; SASAHIRA; KIRITA, 2018).

2.2 Bcl-2

A proteína Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2), primeira descrita da família de proteínas Bcl-2, apresenta esse nome pois foi descoberta a partir de estudos com linfomas não Hodgkin em humanos. Nos linfomas, existe uma translocação t(14:18) que altera o posicionamento do gene Bcl-2, que de sua localização normal no cromossomo 18 (18q21), move-se para o locus de cadeia pesada da imunoglobulina, no cromossomo 14, o que proporciona a ativação da transcrição gênica do Bcl-2 e a superprodução das proteínas por ele transcritas. Dessa forma, o gene Bcl-2 age como um proto-oncogene, promovendo a sobrevivência celular por meio da inibição de apoptose (KIRKIN; JOOS; ZÖRNIG, 2004).

A família de proteínas Bcl-2 apresenta cerca de 12 proteínas cujas estruturas apresentam homologia, diferindo entre si, apenas por alguns aminoácidos (THOMAS et al., 2013) sendo divididas em grupos de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, de acordo com sua função intracelular e homologia, como representado na figura 6. Localizam-se usualmente na membrana mitocondrial, retículo endoplasmático e nuclear. Possivelmente proteínas pró-apoptóticas que estejam no citosol, quando ativadas, sofrem mudanças conformacionais e migram para a membrana externa da mitocôndria, promovendo a apoptose (AKL et al., 2014; BURLACU, 2003).

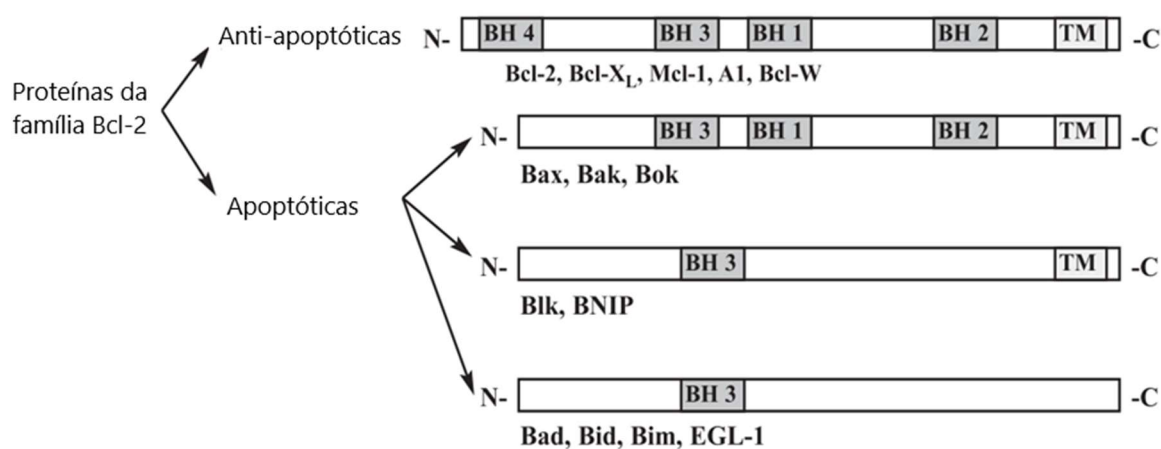


Figura 6. Representação esquemática das características estruturais das proteínas Bcl-2 pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. As estruturas protéicas estão representadas em sua forma linear, BH1-BH4 representam os domínios homólogos e TM representa

o carboxi-terminal do domínio de membrana hidrofóbico. As proteínas Bcl-2 são formadas por proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1, Bcl-W) com os quatro domínios BH e TM; e proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak e Bok) apresentando os domínios TM e BH1-BH3, sem o domínio BH4 e ligantes pró-apoptóticos apresentando apenas o domínio BH3 (Bik, BNIP) ou sem o domínio TM (Bad, Bid, Bim, EGL-1). Figura adaptada de BURLACU (2003).

As proteínas pró-apoptóticas BAK, BAX e BOK, ao receberem sinalização de morte celular sofrem oligomerização, formando poros na membrana mitocondrial, proporcionando o aumento de sua permeabilidade e extravasamento de citocromo c para o citoplasma, este se liga ao Fator de ativação de apoptose 1 (Apaf-1), formando o complexo apoptossomo, que ativa as caspases, levando a célula a morte (THOMAS et al., 2014).

As proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 e A1, por sua vez, têm a capacidade de bloquear a ação de BAK e BAX, possivelmente pela formação de heterodímeros com essas moléculas, preservando a integridade da membrana mitocondrial (BORNER, 2003) (figura 7). O equilíbrio relativo entre a atuação das proteínas da família Bcl-2 é fundamental no controle dos processos apoptóticos, proporcionando sua ativação ou inibição, indiretamente (CHIPUK et al., 2010; FARIA et al., 2006).

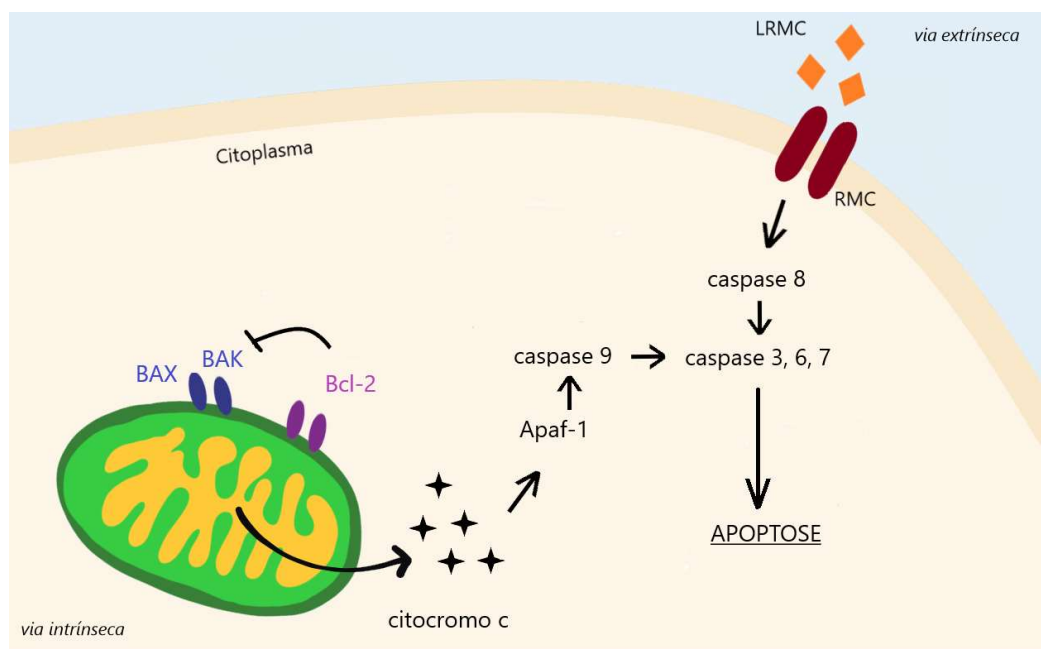


Figura 7. Representação das vias apoptóticas intrínseca e extrínseca. **Via intrínseca:** Proteínas pró-apoptóticas como BAX e BAK, quando estimuladas, provocam a saída de citocromo c para o citoplasma celular, que se complexa com Apaf-1 e ativa as caspases, promovendo a apoptose. As proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (representada por Bcl-2) inibem a ação de BAX e BAK. **Via extrínseca:** A ativação de

receptores de morte celular pelos seus ligantes promove a liberação das caspases, levando a apoptose. LPMC: Ligantes do receptor de morte celular. RMC: Receptor de morte celular.

O equilíbrio entre as proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas da família Bcl-2 é responsável por determinar se a célula entrará em processo de apoptose ou não. Além disso, a família de proteínas Bcl-2 possivelmente controla a homeostase intracelular de Ca^{2+} , regulando o seu armazenamento no retículo endoplasmático (BURLACU, 2003). Sabe-se que as variações dos níveis de cálcio intracelular são capazes de promover a apoptose, pois tanto em elevadas concentrações quanto em baixas concentrações, impossibilitam as atividades funcionais da mitocôndria (CHIPUK et al., 2010; KIRKIN; JOOS; ZÖRNIG, 2004) . No retículo endoplasmático, as proteínas Bcl-2 são capazes de bloquear o receptor inositol 1,4,5-trifosfato, impedindo o fluxo de Ca^{2+} e assim, impedindo processos que sinalizam a morte celular (AKL et al., 2014; BURLACU, 2003).

2.3 Bcl-2 e o câncer

A célula tumoral é exposta a vários estímulos apoptóticos durante seu desenvolvimento. A proliferação descontrolada leva a limitações no suprimento de nutrientes e oxigênio para as células, que então passam a precisar desenvolver mutações e mecanismos para sobreviver a este ambiente hostil. Um desses mecanismos é a inibição da morte celular por meio de evasão aos processos apoptóticos devido à super expressão de Bcl-2 (DUAN et al., 2016; KIRKIN; JOOS; ZÖRNIG, 2004; THOMAS et al., 2013).

Vários tipos de câncer, como leucemias, melanomas, câncer de mama, próstata, câncer colorretal, hepatocarcinomas, gliomas e carcinomas epidermóides orais tem sido associados a alta expressão de Bcl-2 (THOMAS et al., 2013; UM, 2016). Loro e colaboradores (2005) mostraram que a expressão aberrante de Bcl-2 e BAX, concomitantemente com outras alterações moleculares, está relacionada com a progressão da displasia epitelial oral para o CEO (LORO; JOHANNESSEN; VINTERMYR, 2005). Alguns estudos também associam a Bcl-2 e outras proteínas, ao favorecimento da motilidade celular e assim possibilitando a metástase, estando estes eventos relacionados a pior prognóstico (DUAN et al., 2017; XIONG et al., 2016; YIP;

REED, 2008).

Além disso, a habilidade anti-apoptótica da proteína Bcl-2 tem sido relacionada com a resistência à quimioterapia, por agirem impedindo a morte celular induzida pelas drogas citotóxicas (XIONG et al., 2016). Logo, a identificação e compreensão das vias de sinalização que controlam a expressão e função das proteínas membros da família Bcl-2 pode favorecer a descoberta de potenciais alvos terapêuticos (DELBRIDGE et al., 2016).

Nos últimos anos, várias drogas inibidoras das proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas têm sido desenvolvidas e testadas em diferentes tipos de câncer, com o propósito de aumentar a sensibilidade dos tumores à quimioterapia ou até mesmo destruir essas células como agentes únicos, contribuindo dessa maneira para um tratamento personalizado e diferenciado para tumores que apresentem alta expressão de Bcl-2 (DELBRIDGE; GRABOW; STRASSER ; VAUX, 2016; VOGLER, 2014). Grande parte das novas drogas mimetizam a ação das proteínas compostas pelos domínios BH3 e tem como alvo, Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, como a droga chamada navitoclax (ABT-263) e o fármaco ABT-199 que age especificamente em Bcl-2. As combinações destes fármacos com outras drogas anticâncer aumenta a eficácia do tratamento (CZABOTAR et al., 2014).

2.4 Indicadores de prognóstico em CEO

Quando o diagnóstico do CEO é realizado em estádios iniciais, a chance de uma resposta favorável ao tratamento e melhor qualidade de vida do paciente é maior.

Contudo, a maiorias dos casos de CEO são diagnosticados em estádios avançados, o que compromete a qualidade de vida do paciente, que apresentam um pior prognóstico e menores taxas de sobrevida, que é de aproximadamente 5 anos (SINEVICI; O'SULLIVAN, 2016).

Atualmente, o Sistema de Classificação Maligna dos Tumores, o sistema TNM, é o principal critério clínico para direcionamento do tratamento. No entanto, esta classificação não é suficiente para predizer o comportamento tumoral e agressividade, uma vez que pacientes com o mesmo estágio podem apresentar respostas variadas

ao tratamento, indicando assim diferente comportamento tumoral (BLATT et al., 2017).

O avanço na área de biologia molecular dá suporte para a compreensão das alterações celulares que ocorrem durante a carcinogênese e possibilita a identificação de moléculas capazes de sinalizar a transformação maligna, identificar características de resistência a tratamentos e apontar maiores chances de recidivas (RIVERA, 2015).

Essas moléculas, conhecidas como biomarcadores, podem ser genes, RNA mensageiros, proteínas e metabólitos celulares, apresentando valor preditivo, de diagnóstico ou de prognóstico. Como exemplo, recentemente, a proteína p16 foi associada à presença de HPV de alto risco e tem sido utilizada como biomarcador de prognóstico em carcinoma epidermóide de orofaringe, auxiliando na determinação da conduta terapêutica (AJCC, 2017).

Em carcinoma epidermóide oral, no entanto, não existem biomarcadores disponíveis que possam ser utilizados na prática clínica, seja com a finalidade de diagnóstico ou prognóstico (RIVERA et al., 2017). Assim, estudo de biomarcadores de prognóstico e progressão tumoral são importantes para identificarem novos marcadores que possam ser aplicados na prática clínica. Dessa forma, nos propomos a investigar a expressão da proteína Bcl-2 dos diferentes segmentos de epitélio adjacente ao tumor, displasia e tecido tumoral dos pacientes diagnosticados com CEO e avaliarmos sua aplicabilidade como possível biomarcador de progressão tumoral.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão da proteína Bcl-2 como potencial biomarcador de prognóstico e progressão tumoral em carcinoma epidermóide oral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a associação entre a expressão da proteína Bcl-2, os dados clínico-patológicos dos pacientes com carcinoma epidermóide oral as características histológicas: infiltrado linfocitário tumoral (TIL), padrão de invasão tumoral, gradação tumoral, invasão vascular, linfática e perineural;
- Verificar a aplicação da expressão da proteína Bcl-2 como biomarcador de prognóstico em CEO, através da análise dos indicadores sobrevida global e sobrevida livre de doença.
- Avaliar a participação da proteína Bcl-2 na progressão tumoral, analisando a expressão protéica na transição epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor.

4 MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo, sob o processo nº 318/2011, foi integralmente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Integrado de Atenção à Saúde, Vitória - ES (Apêndice A), pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Parecer nº 681/2011) (Apêndice B) e também pelo *National Research Ethics Service* (NRES) - Coventry & Warwickshire (EC.10.H1210.9) (Apêndice C).

4.2 CASUÍSTICA

Trata-se de um estudo analítico longitudinal, realizado no período de 2011 a 2018, no qual foram utilizadas amostras biológicas e dados clínicos de pacientes atendidos nos serviços de cirurgia de cabeça e pescoço do Hospital Santa Rita de Cássia (HSRC), Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM), localizados em Vitória, Espírito Santo e University Hospitals Coventry and Warwickshire NHS Trust, localizado em Birmingham, Reino Unido.

Seguindo os critérios de inclusão estabelecidos, foram recrutados apenas indivíduos com diagnóstico conclusivo de carcinoma epidermóide da cavidade oral (CIDs C02.0 - C06.9), sem tratamento prévio, de ambos os sexos, grupos étnicos e faixa etária superior a 18 anos, com lâminas e blocos histológicos de biopsias e ressecção cirúrgicas em bom estado. Todos os casos incluídos no estudo apresentam seguimento clínico mínimo de 24 meses. O acompanhamento foi realizado pela equipe médica com intervalos de 6 a 12 meses, até completar 60 meses após o diagnóstico ou óbito.

No total foram recrutados 109 casos com diagnóstico de carcinoma epidermóide oral, sendo 57 casos provenientes do HUCAM e HSRC e, 52 casos do University Hospitals Coventry and Warwickshire NHS Trust.

As informações referentes às características clínicas, como idade, sexo, estadiamento

clínico (sistema TNM), sítio anatômico do tumor, histórico do consumo de álcool e tabaco, informações sobre o tratamento e evolução clínica foram obtidos por meio da análise de prontuários, acompanhamento durante as consultas médicas e entrevista. Foram considerados ex-tabagistas e ex-etilistas indivíduos que não possuíam histórico do consumo de tabaco e álcool por, no mínimo, 12 meses (KFOURI, et al., 2018) (APÊNDICES D e E).

Amostras de tecido tumoral incluído em parafina e lâminas histológicas foram coletadas entre 2011 e 2014, somente sendo incluídos nas análises laboratoriais os casos que apresentaram, no mínimo, 75% da área tecidual total representada por tumor.

O modelo de progressão tumoral utilizou amostras de epitélio adjacente ao tumor, displasia e tecido tumoral provenientes de um mesmo paciente, em triplicata, para avaliar a evolução da doença. Contudo, ao longo das análises foi detectada redução de material disponível para análises devido à perda de cortes histológicos do TMA, o que justifica diminuição do número inicial (n) de cada região. Dos 109 pacientes incluídos no estudo, obtivemos viabilidade em 98 secções tumorais, 37 secções de frente de invasão, 55 secções de displasia e 45 secções de epitélio adjacente ao tumor para análise. Deste grupo amostral, 28 pacientes apresentaram todos os segmentos íntegros para análise, apresentando epitélio adjacente ao tumor, displasia e tecido tumoral viáveis, que foram utilizados para a avaliação do modelo de progressão tumoral.

4.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os tecidos tumorais obtidos a partir de biópsias ou ressecção cirúrgica foram fixados em formalina, emblocados em parafina, corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE).

As lâminas coradas em HE foram analisadas e classificadas de acordo com a OMS (2017) quanto ao grau de diferenciação tumoral, sendo os tumores divididos três grupos distintos: tumores bem diferenciados, no qual a arquitetura tecidual se

assemelha ao padrão normal do epitélio estratificado escamoso com acentuada queratinização; tumores moderadamente diferenciados, em que observa-se grau moderado de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica presente e queratinização moderada; e tumores pouco diferenciados, com predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas e mínima queratinização.

As displasias foram classificadas em baixo e alto risco de malignização, seguindo os critérios definidos por Kujan e colaboradores (2006), utilizando critérios citológicos e estruturais definidos pela OMS (BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, 2005). Foram consideradas displasias de alto risco quando existiam pelo menos 4 alterações na arquitetura tecidual e pelo menos 5 alterações citológicas (KUJAN et al., 2006).

Ademais, avaliou-se a invasão perineural, linfática e vascular de acordo com os critérios estabelecidos pelo *The Royal College of Pathologists* (HELLIWELL, WOOLGAR, 2013), que estabelece em lâminas de HE, que a presença de células tumorais no espaço perineural, linfático e vascular caracteriza a invasão tumoral nesses sítios.

O padrão de invasão tumoral foi avaliado e classificado de acordo com a análise da infiltração das células tumorais presentes no fronte de invasão tumoral ao tecido subjacente. A avaliação seguiu os critérios estabelecidos por Bryne e colaboradores (1992), sendo assim categorizadas em padrão de invasão tumoral tipo I, compressivo com bordas infiltrantes bem delineadas; tipo II, margens de progressão tumoral infiltrando como cordões sólidos ou faixas; tipo III, tumor cujas margens infiltrativas contêm grupos pequenos ou cordões de células; e tipo IV, onde o fronte de invasão mostra marcante dissociação celular em pequenos grupos ou células isoladas.

O Infiltrado Linfocitário Tumoral (TIL, Tumour-infiltrating Lymphocytes) foi classificado em alto, moderado e baixo, seguindo os critérios estabelecidos por Marsh e colaboradores (2011), no qual um TIL alto apresenta-se difuso, com presença do infiltrado em mais de 80% do tumor/estroma; TIL moderado, quando desigual, e presente entre 10-80% do tumor/estroma; e TIL baixo, quando fraco ou ausente, presente em menos que 20% do tumor/estroma.

4.4 MICROARRANJO TECIDUAL

A construção do microarranjo tecidual (TMA) foi realizada no The Nottingham Health Science Biobank, localizado no Reino Unido. Para cada caso e região selecionada (epitélio adjacente ao tumor, displasia, frente tumoral e porção mediana) as amostras foram alocadas em triplicata.

As lâminas coradas em HE foram digitalizadas na plataforma *Pannoramic digital slide scanner* (3DHISTECH®, Budapeste, Hungria) e avaliadas pelo sistema de análise de imagens *Pannoramic Viewer* software (versão 1.15 3DHISTECH®, Budapeste, Hungria). Áreas de amostras de tecido representativas do tumor (frente de invasão e porção mediana), displasia e epitélio adjacente ao tumor identificadas foram então selecionadas utilizando a ferramenta para confecção do TMA.

Em seguida, os blocos correspondentes às lâminas selecionadas, denominados blocos doadores, foram digitalizados pelo equipamento TMA Master II (3DHISTECH®, Budapeste, Hungria). As imagens geradas do escaneamento das lâminas, com as áreas previamente selecionadas para confecção do TMA, foram alinhadas às imagens fornecidas pelo escaneamento dos blocos. A partir do alinhamento entre as imagens das lâminas e de seus respectivos blocos, fragmentos cilíndricos de 0,6 mm foram obtidos dos blocos doadores e inseridos em um bloco inicialmente vazio, chamado bloco receptor. Essa transferência de tecidos de regiões selecionadas para o bloco receptor deu-se de forma automatizada, em locais previamente definidos em uma matriz previamente construída, utilizando o equipamento TMA Master II.

Posteriormente, os blocos receptores foram seccionados em um micrótomo para a obtenção de cortes histológicos sequenciais de 3 µm de espessura, dispostos em lâminas polarizadas, silanizadas e lapidadas (StarFrost® Advanced Polycat, Braunschweig, Alemanha).

4.4.1 Validação TMA

Para a validação do uso de Imunohistoquímica (IHQ) em TMA foram utilizadas 10

lâminas convencionais contendo tecido tumoral de CEO imunomarcadas com Bcl-2 no qual as avaliações de expressão da proteína foram realizadas por dois patologistas independentes. Não houve diferença significativa inter-observadores entre as leituras realizadas. Em seguida, estes valores de expressão protéica foram comparados com os obtidos da leitura realizada nos TMAs utilizando análise de concordância Kappa, não sendo observada diferença significativa entre leituras efetuadas em lâminas convencionais e lâminas de TMA. Após validação do método, a utilização do TMA foi adotada pelas vantagens que possui em relação à uniformização das reações, economia de tempo empregado e otimização do uso de anticorpos, reagentes e tecidos.

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA

4.5.1 Imunohistoquímica da proteína Bcl-2

Para a realização da técnica de IHQ, lâminas de TMA foram desparafinizadas em estufa 60°C por 1 hora, seguida da imersão em xilol e reidratadas em séries decrescentes de álcool etílico (100%, 95% e 70%) sendo posteriormente lavadas com água destilada. Para a recuperação antigênica as lâminas foram incubadas em tampão de citrato pH=6,0 sob pressão, à temperatura de 121°C por 3 minutos (Pressure Cooker, Aptum Biologics-UK) e consecutivamente, resfriadas à temperatura ambiente. Para a neutralização da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas com peróxido de hidrogênio 3%, e posteriormente submetidas à lavagem com tampão Tris Dodecil-sulfato de sódio (SDS - TBS) por 5 minutos em cada etapa. As lâminas foram então incubadas a 4°C overnight com o anticorpo primário monoclonal anti-Bcl-2 camundongo (Peptídeo sintético composto pelos aminoácidos 41-54 da oncoproteína BCL2 humana, Clone 124, DAKO) na diluição 1:500. As lâminas foram lavadas com TBS, e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário (Post Primary, Novolink™ – Novocastra™) por 30 minutos e lavadas por 5 minutos em TBS. Em seguida, procedeu-se à revelação da reação utilizando o 3.3'-Diaminobenzidina (DAB) em uma solução cromogênica à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas contra-coradas com hematoxilina de

Harrys (HHS80, Sigma-Aldrich®), por 30 segundos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água corrente por 10 minutos, as lâminas foram desidratadas com isopropanol em séries crescentes de 60, 70 e 90%, passadas em xilol e montadas com solução de resina não aquosa (Entelan® - Merck Millipore) e recobertas com lamínula.

Foram utilizados como controles positivos da reação fragmentos de tonsila humana. Como controle interno da reação, foi considerada a marcação dos queratinócitos da camada basal. Os controles negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário, o qual foi substituído por tampão de lavagem (PBS). A reação com o anticorpo utilizado foi previamente submetida a testes para padronização.

4.5.2 Análise de expressão protéica

Para avaliar a expressão de Bcl-2 foi considerada a marcação citoplasmática dos queratinócitos utilizando o método *H-score* (ATARBASHI, S., ELAHI, M., KHANI, M., & RAKHSHAN, 2014; FARIA et al., 2006). Este método consiste em uma análise semi-quantitativa obtida pelo produto da intensidade da imunomarcação (variando de 0-3) pela porcentagem de células marcadas em cada nível de intensidade (0 a 100%). Nessa escala, 0, representa ausência de imunomarcação; 1, imunomarcação de fraca intensidade; 2, imunomarcação de intensidade moderada e 3, imunomarcação de intensidade forte.

Logo, foram calculadas a porcentagem de células imunomarcadas referentes a cada grau de intensidade de coloração (0-3) em cada amostra, em todas as secções, por pelo menos 2 examinadores independentes, utilizando microscópio de luz (200X). Em caso de discordância, as lâminas foram reavaliadas em consenso. O *H-score* foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$H - score = 1 \times (\% \text{ células intensidade } 1) + 2 \times (\% \text{ células intensidade } 2) + 3 \times (\% \text{ células intensidade } 3)$$

Avaliou-se a expressão tecidual de Bcl-2 em células tumorais de CEO (fronte tumoral e porção mediana do tumor), displasia e epitélio adjacente ao tumor. A categorização quanto à alta e baixa expressão ocorreu através da instituição do ponto de corte, baseado na mediana de expressão da proteína Bcl-2 no epitélio adjacente ao tumor, obtida pelo cálculo do *H-score*.

4.6 ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES

Os indivíduos diagnosticados com CEO foram acompanhados por um período de até 5 anos, mediante entrevistas e análise de prontuários referente aos tratamentos realizados. O primeiro seguimento (F1) foi realizado no período de 6 a 18 meses após diagnóstico clínico e determinação de tratamento de primeira linha; o segundo acompanhamento ocorreu 6 meses após o F1 e o terceiro e quarto seguimentos ocorreram em 30 e 60 meses após diagnóstico clínico, respectivamente. O seguimento foi realizado pela equipe médica e os resultados clínicos foram adicionados em formulários de acompanhamento específicos (APÊNDICE F) e complementados com entrevistas e análises de prontuários.

Para avaliação da progressão tumoral foram levadas em consideração informações concernentes à remissão do tumor, recidiva ou óbito e o tipo de tratamento recebido.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram construídas no *software* SPSS® v. 20 e o nível de confiança considerado para todos os testes foi de 95%, sendo $p \leq 0,05$.

Para avaliar as variáveis clínico-patológicas com a expressão tumoral de Bcl-2 utilizou-se o Teste Qui-Quadrado. O teste de Friedman foi utilizado para avaliar a progressão tumoral, na avaliação da expressão de Bcl-2 entre os segmentos epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor. Para estabelecer as curvas de Sobrevida global (SG) e Sobrevida livre de doença (SLD) utilizou-se o modelo de Kaplan-Meier com índice de confiança igual a 95%. Para a avaliação da sobrevida global, considerou-se como ponto inicial o dia do diagnóstico clínico e ponto final o dia do óbito ou do último seguimento. Para SLD foi considerado como ponto inicial a data do término do

tratamento de primeira linha e, como ponto final, o dia em que o desfecho ocorreu, ou seja, a recidiva. Para os casos nos quais não se sucedeu o desfecho, o dia do retorno ou última data conhecida por estar vivo foi considerada.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Dos 109 pacientes diagnosticados com CEO incluídos no estudo, a maior parte (78,0%) eram do sexo masculino e com idade superior a 60 anos. A média de idade da população atendida foi de 60,49 anos (Mínimo: 32 anos; Máximo: 98 anos).

Em relação aos hábitos de vida, 58,1% dos indivíduos eram fumantes ativos, destes a maioria do sexo masculino (88%) e do total, 25,6% eram ex-tabagistas, também com predominância masculina. Logo 77 dos 109 indivíduos incluídos no estudo apresentaram exposição ao tabaco em algum momento da vida. Os homens também lideraram o consumo de álcool, representando 86,4% dos 44 pacientes consumidores ativos de bebidas alcólicas, e 84,2% dos 19 pacientes foram caracterizados como ex-etilistas. De todos os indivíduos avaliados, 52,5% relataram hábito de consumir bebidas alcólicas e fumar, concomitantemente.

A língua representou o subsítio anatômico mais acometido da cavidade oral, com 69,7% dos casos, seguida do assoalho bucal (11,0%). Em relação ao tamanho do tumor, um predomínio de 39,4% apresentaram tamanho do tumor T4, e 37,6% tiveram comprometimento linfonodal detectado clinicamente ou por tomografia computadorizada. Ao diagnóstico 61,2% dos casos incluídos no estudo apresentaram estadiamento avançado (Estádios III e IV). Recidivas foram descritas em 32,1% dos casos. Em uma análise dos primeiros 24 meses de seguimento, 54,1% (n=46) evoluíram ao óbito, destes 71% apresentavam estadiamento IV. As características clínico-patológicas da população analisada encontram-se detalhadas na tabela 1.

Tabela 1. Características clínico-patológicas dos indivíduos com CEO (n=109)

Características Clínico-patológicas	n	(%)
Sexo		
Masculino	85	78,0
Feminino	24	22,0
Idade (anos)		
< 60	56	51,4
≥ 60	53	48,6
Tabagismo^a		
Tabagista	50	45,9
Ex-tabagista	22	20,2
Nunca	14	12,8
Etilismo^a		
Etilista	44	57,9
Ex-etilista	19	25,0
Nunca	13	17,1
Sítio Anatômico		
Língua	76	69,7
Assoalho bucal	12	11,0
Gengiva	9	8,2
Área retromolar	6	5,6
Mucosa jugal	3	2,8
Palato duro	2	1,8
Mucosa labial	1	0,9
Tamanho do tumor primário^a		
T1	16	15,4
T2	41	39,4
T3	6	5,8
T4	41	39,4
Metástase linfonodal^a		
N0	57	58,2
N+	41	41,8
Estadiamento clínico^a		
I	11	11,2
II	27	27,6
III	9	9,2
IV	51	52,0

Não informados: Tabagismo (n=23); Etilismo (n=33); Tamanho tumor primário (T) (n=5); Metástase linfonodal (n=11); Estadiamento (n=11); N0: ausência de metástase linfonodal; N+: presença de metástase linfonodal.

Em relação ao grau de diferenciação tumoral encontrado, a maior parte dos casos analisados foram classificados como tumores moderadamente diferenciados (57,1%), enquanto 36,4% exibiram tumores bem diferenciados e a minoria, tumores pouco diferenciados (6,5%). A gradação tumoral foi baseada na classificação dos tumores da Organização Mundial da Saúde (BARNES et al., 2005), como representadas na figura 8.

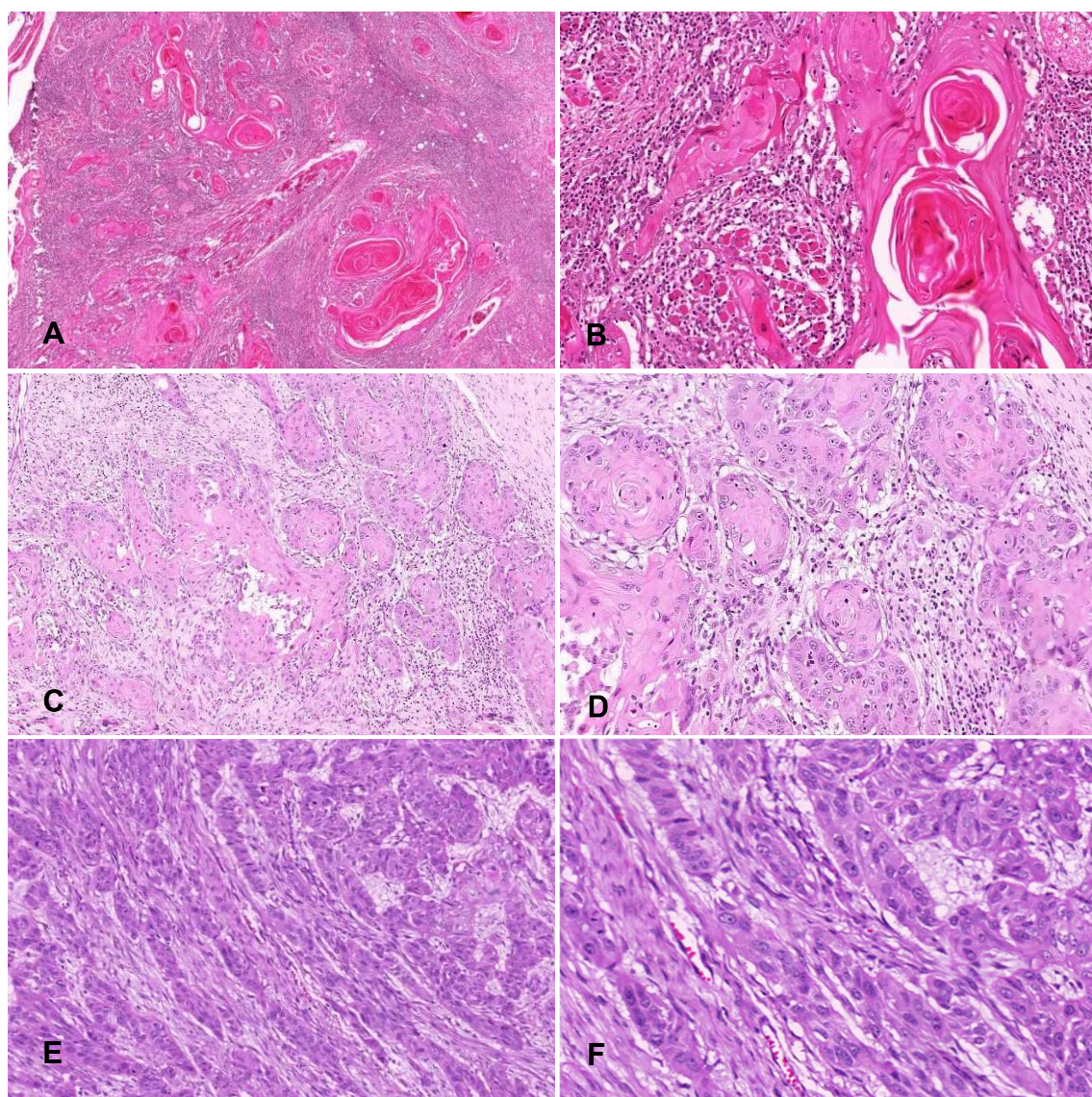


Figura 8. Fotomicrografia representativa da gradação tumoral em CEO, seguindo os critérios da OMS. (A, B) bem diferenciado; (C, D) moderadamente diferenciado; (E,F) pouco diferenciado. Coloração HE. Magnificação original A, C, E 100x e B, D, F 200x.

O TIL foi categorizado em baixo, moderado e alto, de acordo com a quantidade de linfócitos presentes na região peri e intratumoral (MARSH et al., 2011). Um reduzido

número de linfócitos infiltrantes foi encontrado em 24,5% dos tumores, enquanto quantidade moderada e alta foram observadas em 56,6% e 18,9% dos tumores analisados, respectivamente. A figura 9 ilustra o infiltrado linfocitário tumoral em CEO.

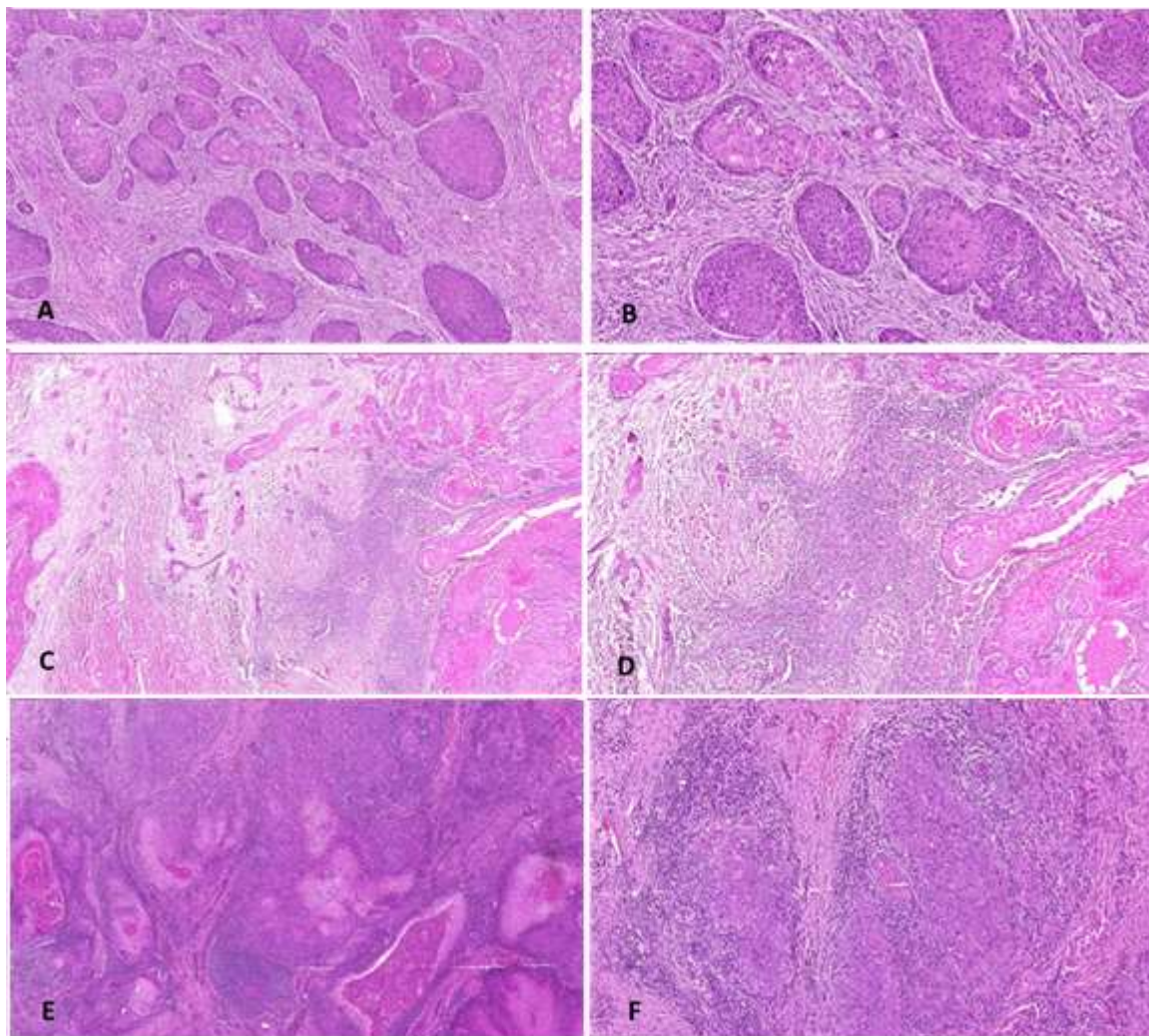


Figura 9. Fotomicrografia ilustrativa do Infiltrado linfocitário tumoral em CEO. (A, B) Baixo infiltrado linfocitário; (C,D) Moderado infiltrado linfocitário; (E,F) Elevado infiltrado linfocitário. Coloração HE. Magnificação original A, C, E 100x e B, D, F 200x.

Elevado Infiltrado linfocitário tumoral foi associado com estadiamentos iniciais (I/II) ($p=0,001$).

A figura 10 representa os diferentes padrões de invasão tumoral, conforme estabelecido por Bryne e colaboradores (BRYNE et al., 1992). O padrão com maior ocorrência na população estudada foi o padrão III (43,6%), representado por pequenos grupos ou cordões de células infiltrantes, seguido do tipo IV (39,7%) no qual

há marcante dissociação em grupos pequenos ou células individuais. Os padrões menos frequentes foram o tipo II (9,0%), com cordões sólidos e faixas e o tipo I (7,7%), compressivo e com bordas bem delineadas.

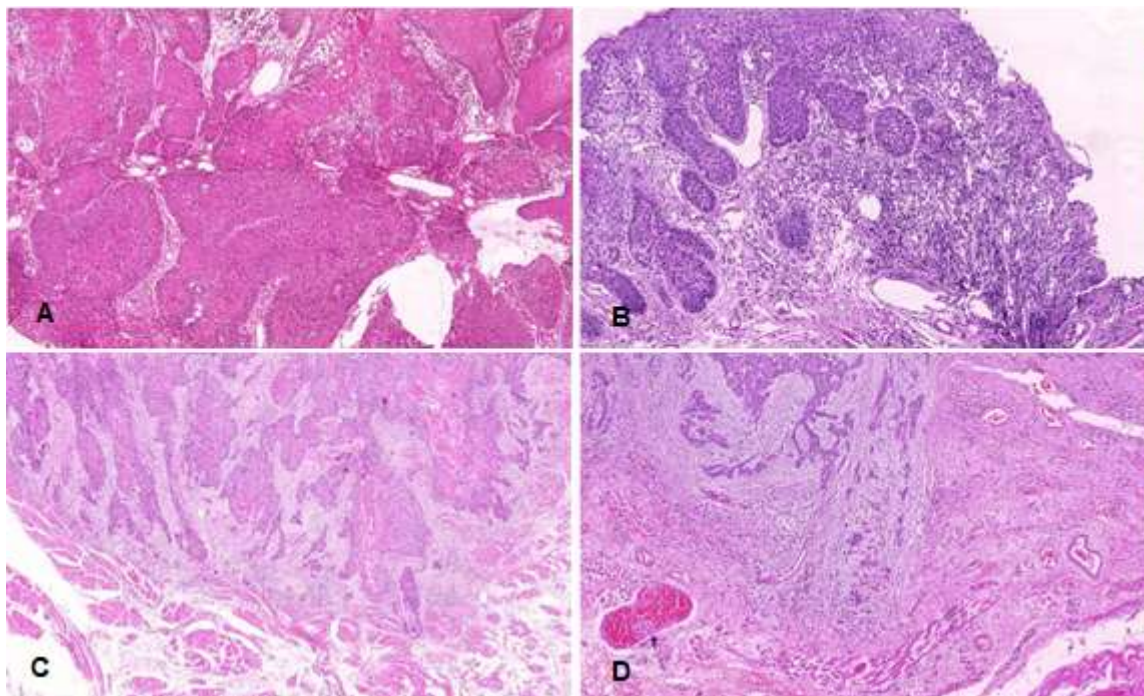


Figura 10. Fotomicrografia de CEO representando o padrão de invasão tumoral conforme proposto por Bryne et al., 1992. (A) Padrão de invasão tipo I; (B) Padrão de invasão tipo II; (C) Padrão de invasão tipo III; (D) Padrão de invasão tipo IV. Coloração HE. Magnificação original 100x e 200x.

Foram observadas invasão vascular em 83,8% dos casos de CEO analisados, invasão perineural em 66,7%, enquanto 43,6% apresentavam invasão linfática. As invasões: vascular (A), linfática (B), e perineural (C) por células neoplásicas em CEO estão indicadas na figura 11.

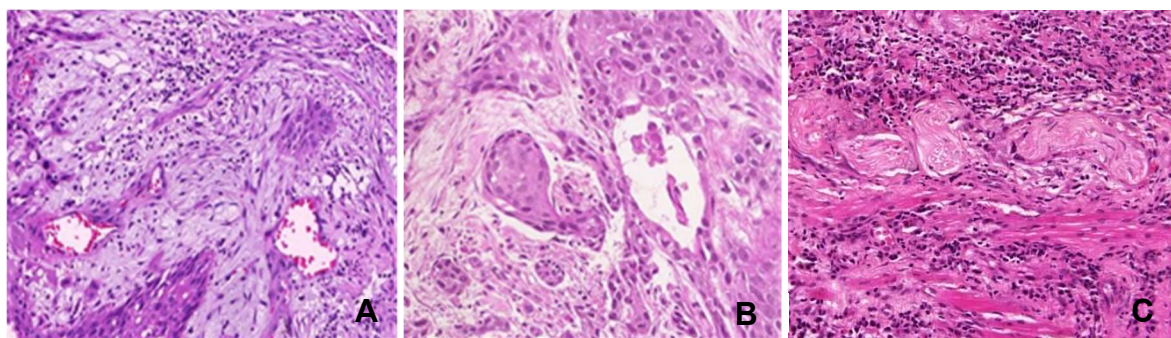


Figura 11. Fotomicrografia dos diferentes tipos de invasão tumoral. (A) Invasão vascular; (B) Invasão linfática; (C) Invasão perineural. Coloração HE. Magnificação 100x.

5.2 EXPRESSÃO DE BCL-2

De acordo com o cálculo de H-score, as medianas obtidas foram de 16,7 na porção mediana tumoral; 11,67 no fronte de invasão; 7,50 nas displasias; 10 nos fragmentos de epitélio adjacente ao tumor. Assim, a expressão tumoral de Bcl-2 nas regiões com *H-score* < 10 foi considerada baixa, enquanto o *H-Score* ≥ 10 foi considerado alta expressão, logo, observou-se alta expressão de Bcl-2 no tumor e baixa expressão na displasia e epitélio adjacente ao tumor. Ao longo das análises foi detectada redução de material disponível para análises devido à perda de cores do TMA, o que justifica diminuição do número inicial (n) de cada região.

Diferença significativa não foi observada quando comparadas as características clínico-patológicas analisadas e a expressão da proteína Bcl-2, como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2. Associação entre as características clínico-patológicas dos indivíduos acometidos por CEO e a expressão da proteína Bcl-2 (porção mediana e frente de invasão tumoral) .

	Porção mediana tumoral (n= 98)			Frente de Invasão (n= 37)		
	Baixa	alta	p	baixa	alta	p
Sexo						
Masculino	28	47	0,546	14	15	0,931
Feminino	7	16		4	4	
Idade (anos)						
≤ 60	21	31	0,588	13	7	0,067
> 60	14	32		5	12	
Tabagismo						
Sim	18	25	0,416	10	4	0,078
Nunca	4	10		1	5	
Ex-tabagista	5	14		5	4	
Etilismo						
Sim	16	23	0,921	9	7	0,723
Nunca	4	5		2	1	
Ex-etilista	6	12		4	3	
Tamanho do tumor						
T1/T2	20	34	0,839	9	15	0,098
T3/T4	14	26		8	5	
Metástase Linfonodal						
N+	8	25	0,077	7	6	0,631
N0	24	32		10	12	
Estadiamento						
I/II	17	24	0,348	7	10	0,492
III/IV	17	36		10	9	

* Teste Qui Quadrado, $p \leq 0,05$.

Em relação as características histológicas dos casos, encontrou-se relevância estatística entre a expressão de Bcl-2 e o TIL ($p=0,001$), sugerindo que quanto maior o infiltrado linfocitário tumoral, maior será a imunomarcação da proteína Bcl-2. As variáveis histopatológicas analisadas estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Associação entre as variáveis histopatológicas e a expressão da proteína Bcl-2 no tecido tumoral (meio e frente de invasão).

	H-Score Tumor			H-Score Fronte		
	baixa	alta	valor de p	baixa	Alta	valor de p
Padrão de invasão						
I	4	8	0,983	2	3	0,196
II	10	19		6	6	
III	15	26		4	9	
IV	4	9		5	1	
TIL						
Baixa	11	12	0,115	9	2	0,001*
Moderada	19	34		8	7	
Alta	3	15		0	9	
Invasão linfática						
Presente	13	19	0,305	8	5	0,256
Ausente	11	27		6	9	
Invasão vascular						
Presente	25	50	0,233	15	15	1,000
Ausente	7	7		2	2	
Invasão perineural						
Presente	9	19	0,317	5	9	0,122
Ausente	8	9		5	2	
Grau de diferenciação						
Bem	14	22	0,803	4	7	0,247
Moderadamente	18	36		12	12	
Pouco	3	4		2	0	

* *Teste Qui Quadrado, $p \leq 0,05$. Padrão de invasão: Tumor n=95, Frente n=36; TIL: Tumor n= 94; Frente= n=35; Invasão linfática: Tumor n=70; Frente = 28; Invasão perineural: tumor n= 45, frente n= 21; Grau de diferenciação: Tumor n= 97, frente n= 37*

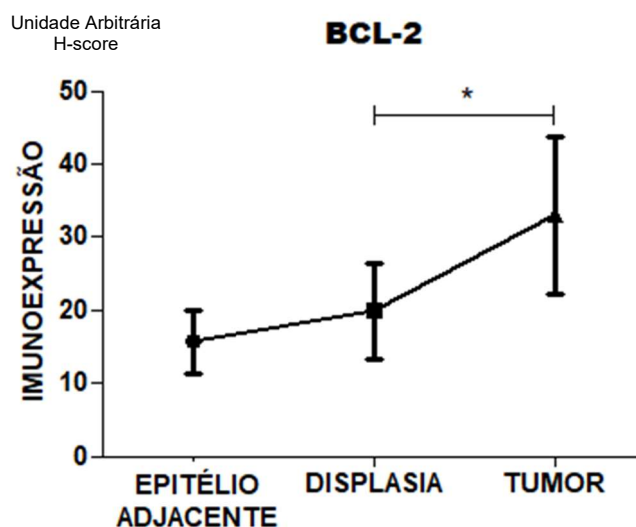
Para avaliar o padrão de expressão da proteína Bcl-2 nos diferentes estágios da progressão do epitélio adjacente ao tumor, passando por displasia e finalizando em tecido tumoral, fez-se o pareamento das amostras contendo informações completas sobre epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor, conforme representado na tabela 4.

Tabela 4. Padrão de expressão de Bcl-2 na progressão tumoral (n=28).

	Média	Desvio padrão	H-Score Mínimo	H-Score Máximo	Valor de p
H-Score epitélio adjacente	15.9821	22.32454	0.00	93.33	0.012*
H-Score displasia	19.9704	34.57001	0.00	130.00	
H-Score tumor	33.6611	55.97337	0.00	240.00	

Teste Friedman: * $p \leq 0,05$.

De acordo com o teste *Friedmen*, houve significância estatística entre a expressão de Bcl-2 e os segmentos analisados ($p=0.012$), sendo assim, rejeita-se a hipótese nula. Continuando o teste é possível identificar que existe significância entre o seguimento da displasia e o tecido tumoral ($p=0,033$). Contudo, não foi observada diferença significativa na expressão de Bcl-2 entre o epitélio adjacente ao tumor e o tecido tumoral ($p=0,069$). A Expressão da proteína Bcl-2 nos segmentos está representada na figura 12.

**Figura 12** - Expressão da proteína Bcl-2 nos segmentos de epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor.

O padrão de imunomarcção de Bcl-2 nas regiões do epitélio adjacente ao tumor, displasia e tecido tumoral estão exemplificados nas Figuras 13 e 14 e 15, respectivamente.

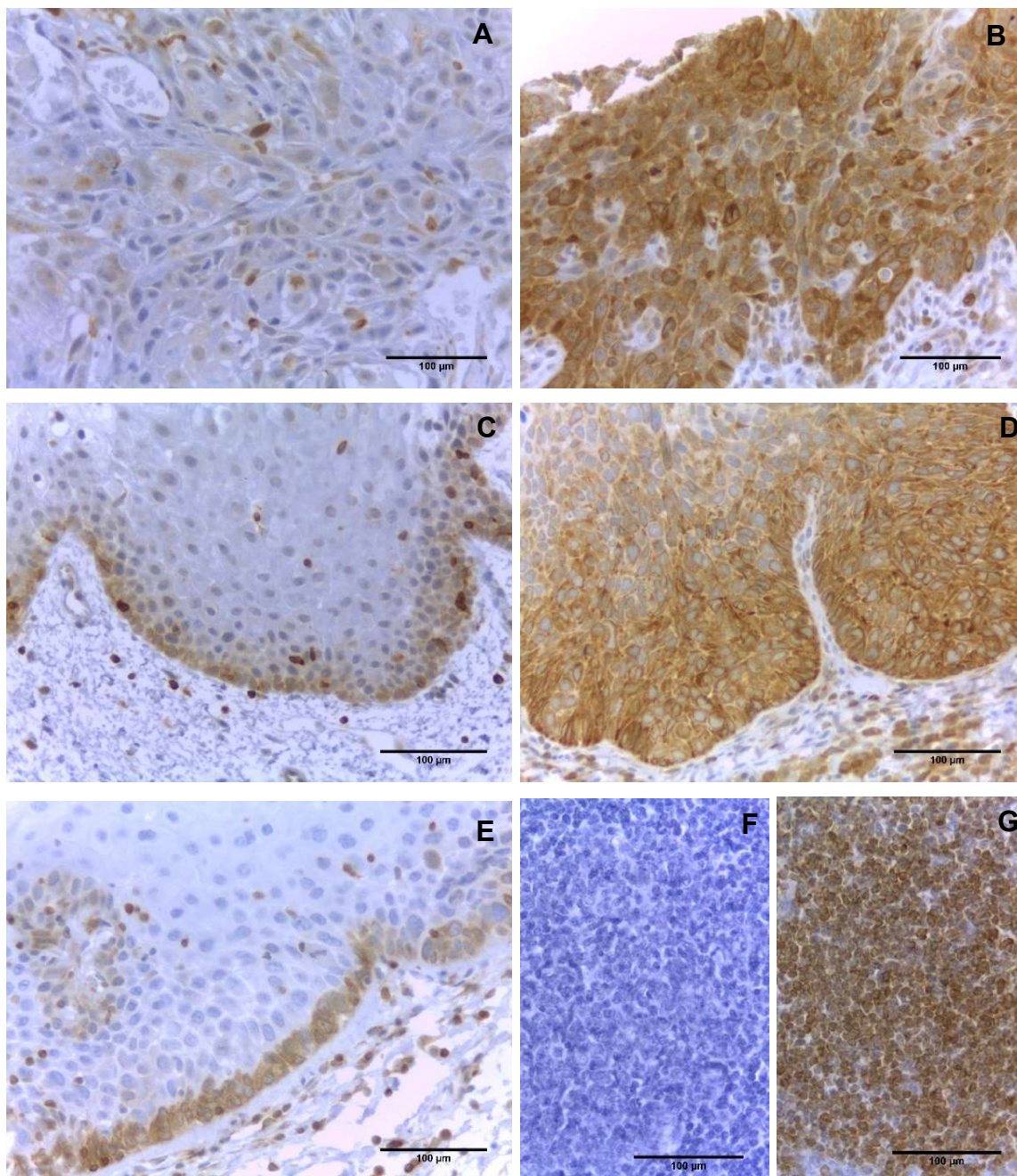


Figura 13. Imunomarcaco de Bcl-2 nos segmentos epitelo adjacente ao tumor, displasia e CEO. (A) Imunomarcaco fraca em tecido tumoral, (B) Imunomarcaco forte em tecido tumoral, (C) Imunomarcaco fraca em displasia, (D) Imunomarcaco forte em displasia, (E) Imunomarcaco fraca em epitelo adjacente ao tumor, (F) Controle negativo tonsila, omisso do anticorpo primrio; (G) Controle positivo de Bcl-2.. Magnificaes originais de 400x.

Analizando os fragmentos de tecidos que continham displasia e classificando-os em baixo e alto risco de acordo com Kujan e colaboradores (2006) no foi observada associao significativa entre a expresso de Bcl-2 e o grau de displasia ($p=0,834$), conforme mostrado na tabela 5.

Tabela 5. Associação entre expressão de Bcl-2 e o grau de displasia (n=44).

Expressão de Bcl-2	Displasia baixo risco		Displasia alto risco		<i>P</i>
	n=27	%	N=17	%	
Alta	16	59,3	10	62,5	0,834
Baixa	11	40,7	7	37,5	

Teste Qui-quadrado para independência. Leitura ausente dos 109 casos: n=65. * $p \leq 0,05$.

5.3 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA

Para avaliar a sobrevida global dos indivíduos, considerou-se um intervalo de 24 meses, período em que a quantidade significativa de óbitos ocorreu, 86,8% dos 53 óbitos avaliados no intervalo de até 60 meses.

Apesar da alta expressão de Bcl-2 ser observada em um maior número de casos que evoluíram para óbito, não se apresentou estatisticamente significante com os índices de sobrevida, como pode-se observar na figura 16.

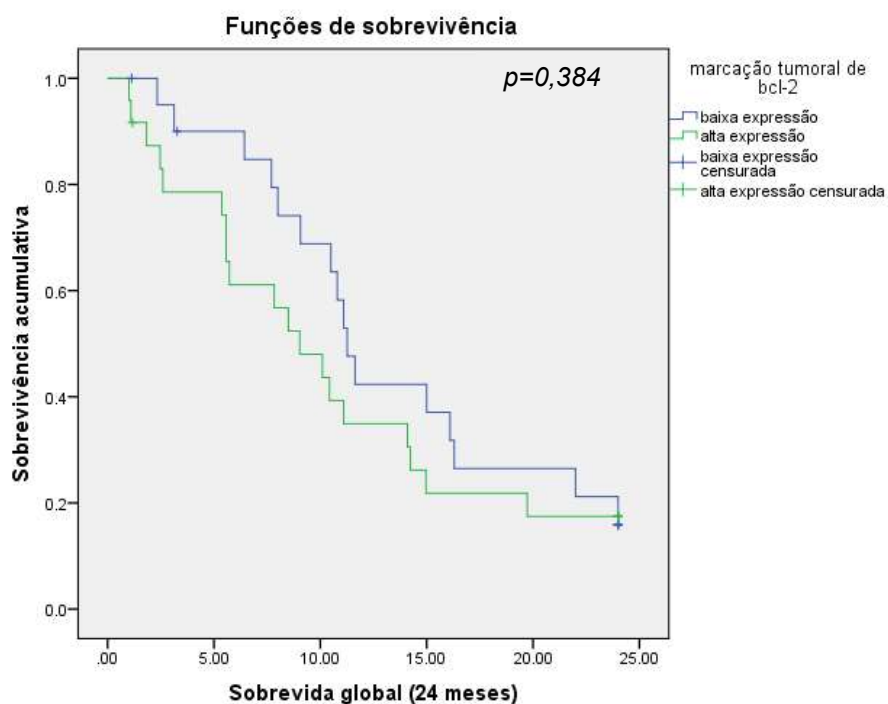


Figura 14. Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida global em relação à expressão de Bcl-2.

Para avaliar a sobrevida livre de doença dos indivíduos, considerou-se um intervalo de 24 meses, período em que a maior parte das recidivas ocorreram 77,1% dos 35 indivíduos evoluíram com a recorrência da doença, num período de 60 meses. Considerando a recidiva local e regional como desfecho final, as curvas de sobrevida livre de doença foram geradas.

A expressão de Bcl-2 no tecido tumoral não se mostrou relacionada com os índices de sobrevida livre de doença, conforme mostrado na figura 17 ($p=0,243$).

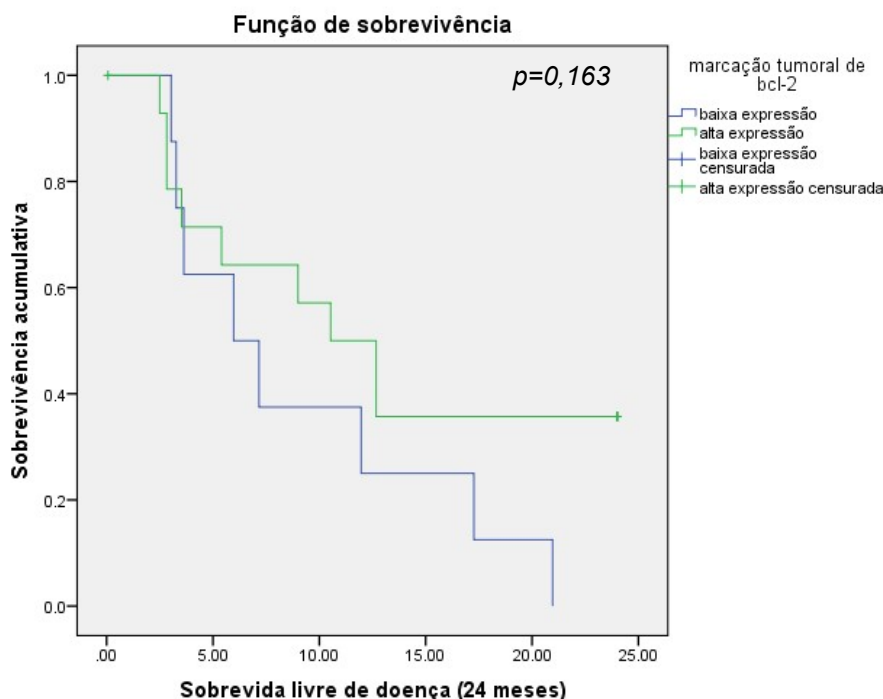


Figura 15. Curva de sobrevida livre de doença em relação à expressão de Bcl-2 pelo método Kaplan-Meier e log-rank.

Quando avaliados os potenciais indicadores de prognóstico: gradação tumoral, padrão de infiltração linfocitário tumoral, invasão de vasos sanguíneos, invasão linfática e perineural, sítio anatômico tumoral e etilismo não foi possível estabelecer correlação com as curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença.

6 DISCUSSÃO

O perfil dos pacientes participantes do presente estudo se assemelha com as características já descritas pelas bases de dados do INCA (2018) e GLOBOCAN (2018), com predominância do sexo masculino (78%), idade avançada (48,6 %, > 60 anos) e histórico de consumo de álcool e tabaco.

O sítio anatômico mais acometido foi a língua, com 69,7% dos casos avaliados, como já esperado, uma vez que o carcinoma epidermóide de língua é o subtipo mais comum e mais agressivo entre os CEO, apresentando uma rápida invasão local e altas taxas de recidiva (JIANHONG; CHIA; TAN, 2012). O estadiamento clínico predominante no momento do diagnóstico foi o estágio IV (52%), o que mostra um diagnóstico tardio na maioria dos casos, o que compromete significativamente na qualidade de vida dos pacientes, com redução das chances de cura. Esse perfil também é descrito pela estimativa do INCA (2018) e por SHRIDHAR e colaboradores (2016), que observaram que grande parte dos casos oriundos de países em desenvolvimento apresentam o mesmo perfil encontrado no presente estudo.

Um pior prognóstico, em geral, é esperado em indivíduos com diagnóstico tardio da doença, pois, além de serem submetidos a cirurgias mais radicais, com esvaziamento cervical, podem receber quimioterapia e radioterapia como tratamentos coadjuvantes ou neoadjuvantes à cirurgia, implicando em efeitos adversos importantes, responsáveis por alta morbimortalidade, além de representar maior custo para os serviços de saúde (MONTERO; PATEL, 2016).

O que ajudaria na clínica seria a utilização de biomarcadores que auxiliassem na conduta médica, permitindo assim o melhor manejo dos pacientes. A proteína Bcl-2 apresenta-se desregulada em diversos tipos de câncer e foi considerada como possível indicador de prognóstico e progressão tumoral em tumores de diferentes sítios anatômicos (ANVARI et al., 2012; FARIA et al., 2006; KIRKIN; JOOS; ZÖRNIG, 2004; VOGLER, 2014). Contudo, há uma divergência entre os valores preditivos dentre os estudos, por não apresentarem a mesma técnica, ou terem uma classificação padronizada desse marcador, o que leva a diferentes interpretações

sobre a sua utilização (COUTINHO-CAMILLO et al., 2010).

A expressão da proteína Bcl-2 foi classificada segundo a média do *H-score* dos seguimentos. Alguns estudos utilizam diferentes padrões de avaliação do *H-score* do Bcl-2, utilizando faixas de *scores* para considerar a alta e baixa expressão da proteína, no lugar da média (PAVITHRA et al., 2017; TENI et al., 2002; ZHANG et al., 2009) o que dificulta a corroboração entre os trabalhos já publicados, uma vez que não existe um padrão definido, como observado por Coutinho Camillo e colaboradores (2010).

Normalmente, no epitélio oral, a expressão da proteína Bcl-2 é restrita à camada basal, possivelmente participando da regulação da diferenciação dos queratinócitos e protegendo as células dos processos apoptóticos. (ARYA; SINGH; DANIEL, 2016; TENI et al., 2002). No tecido tumoral, as células apresentam expressão por toda a extensão do tumor, sendo mais intensa nas camadas basais. No tecido displásico, a maior expressão da proteína ocorre principalmente nas camadas basais e parabasais. Observamos uma alta expressão de Bcl-2 nos tumores e baixa nos fragmentos de displasia e epitélio adjacente ao tumor.

A alta expressão da proteína Bcl-2 foi observada em 63 pacientes (57,8%) e é principalmente expressa nos tumores T1 e T2, apesar de não existir significância estatística ($p=0,839$) e a expressão proteica é ausente em 18 (16,5%) dos 109 casos avaliados. Na literatura é possível observar uma variação na expressão de Bcl-2 nos tumores em cerca de 25% a 87% (ARYA et al., 2016; SURI et al., ZHANG et al., 2010, SINGH et al. 1998).

Em relação as características histológicas, avaliou-se a expressão de Bcl-2 com o grau de diferenciação tumoral, as displasias de alto e baixo risco, a invasão tumoral nos espaços perineural, linfático e vascular, com o padrão de invasão tumoral e com o infiltrado linfocitário. Foram encontradas significância estatística apenas entre a expressão de Bcl-2 e o TIL e entre o segmento displasia e tumor, quando a progressão tumoral foi analisada.

A alta expressão de Bcl-2 no fronte de invasão tumoral associou-se com o alto número de TIL ($p=0,001$), sugerindo que quanto maior o infiltrado linfocitário, maior será a

imunomarcção da proteína Bcl-2. Os infiltrados linfocitários são geralmente indicadores de prognóstico relacionado a sobrevida e comprometimento linfonodal (BRANDWEIN-GENSLER et al., 2005, FANG et al., 2017). Na cavidade oral, CAMISASCA e colaboradores (2009) afirmam que o infiltrado linfocitário é associado a uma resposta imune protetora, contudo sem associação com a expressão de Bcl-2. Já que a proteína Bcl-2 tem participação na regulação da apoptose de linfócitos T, principalmente T CD4+ em pacientes com carcinomas e câncer de laringe (DURAY et al., 2010).

Em relação à progressão tumoral, observou-se um comportamento crescente entre as médias dos scores da imunomarcção da proteína Bcl-2 nos segmentos de tecido normal (15,9821), displasia (19,9704) e tumor (33,6611), tendo significância estatística entre displasia e tumor, indicando um possível papel de biomarcador de progressão, o que corrobora os achados de ARYA e colaboradores (2016), que descrevem que a expressão da proteína Bcl-2 é proporcional ao nível de diferenciação e displasia, sugerindo que a expressão positiva de Bcl-2 relaciona-se com transformações histopatológicas desfavoráveis no CEO e em lesões com potencial transformação maligna, podendo indicar um pior prognóstico. Ao encontrarmos significância estatística entre a displasia e o tecido tumoral ($p=0,033$), também podemos sugerir que a proteína Bcl-2 pode se relacionar com um pior prognóstico.

Ao avaliar a expressão da proteína Bcl-2 entre os graus de displasia, 62,5% das amostras de displasia de alto risco e 59,3% das amostras de displasia de baixo risco apresentaram alta expressão de Bcl-2 e não se observou diferença significativa estatística entre as amostras ($p=0,834$). Contudo, estudos têm mostrado a relação significativa da expressão de Bcl-2 entre lesões com potencial transformação maligna e o câncer oral, indicando que a expressão de Bcl-2 tem participação significativa nos estágios iniciais do desenvolvimento do CEO (PALLAVI et al. 2018; SINGH et al. 1999).

Atualmente, a classificação TNM não consegue, sozinha, proporcionar um diagnóstico preciso, uma vez que tumores com estadiamentos iguais se comportam biologicamente de maneiras diferentes, sendo necessária a utilização de um marcador biológico confiável para auxiliar a conduta médica (PAVITHRA et al., 2017). Os achados da predominância da alta expressão de Bcl-2 em tumores iniciais (T1 e T2) e

a significância da expressão aumentada de Bcl-2 na displasia, sugere que futuros estudos, incluindo um número maior de indivíduos pode indicar um papel significativo do Bcl-2 como biomarcador de progressão tumoral.

Durante o acompanhamento dos pacientes, cerca de 50% evoluíram ao óbito e 32,1% apresentaram recidivas, num intervalo de 60 meses. Ao avaliarmos as características clínicas observadas, concluímos que o estadiamento clínico da doença no momento do diagnóstico, que leva em consideração o tamanho do tumor primário e o acometimento linfonodal, afeta as taxas de sobrevida. SCHENEIDER e colaboradores (2014) observou que na cavidade oral, a taxa de sobrevivência no estadio I é cerca de 70%, enquanto para o estágio IV, é cerca de 30%, logo, quando trata-se um indivíduo nos estadiamentos iniciais a recuperação do paciente é favorável à cura.

A expressão da proteína Bcl-2 não mostrou associação com a sobrevivência e recorrência dos casos de CEO. Os estudos da expressão de Bcl-2 com a sobrevida são controversos. CAMISASCA e colaboradores (2009) relatam que a expressão de Bcl-2 correlaciona-se com uma melhor sobrevida de doença específica, já DUAN e colaboradores (2017) defende que a expressão Bcl-2 relaciona-se com uma pior sobrevida. Camillo-Coutinho e colaboradores (2010), discutem a ausência de um padrão de interpretação dos resultados da expressão de Bcl-2, utilizando metodologia da imunohistoquímica, o que dificulta a universalização da linguagem entre os pesquisadores, que utilizam classificações diferentes.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo nos permitiram observar que a participação da expressão da proteína Bcl-2 como biomarcador de prognóstico não foi relevante, uma vez que não observamos associação entre a expressão da proteína Bcl-2 e os dados clínico-patológicos dos pacientes com carcinoma epidermóide oral e as características histopatológicas: padrão de invasão tumoral, gradação tumoral, invasão vascular, linfática e perineural. A expressão da proteína Bcl-2 também não foi associada às curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença.

No entanto, é importante ressaltar que observamos resultados significantes entre alta expressão de Bcl-2 no fronte tumoral de CEO, com alto infiltrado linfocitário tumoral (TIL), apontando que esse comportamento deve ser melhor investigado, incluindo um número maior de indivíduos analisados.

Além disso, a expressão de Bcl-2 aumentou à medida em que o epitélio progride para a transformação maligna. Dessa forma, a expressão desta proteína pode desempenhar uma possível marcação de grau de risco ao desenvolvimento tumoral. No entanto, estudos longitudinais abrangendo um número significativo de lesões com potencial de transformação maligna precisam ser realizados para avaliar sua aplicabilidade clínica.

8 BIBLIOGRAFIA

- AKL, H. et al. A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: Mitochondria versus endoplasmic reticulum. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 10, p. 2240–2252, 2014.
- ANVARI, Kazem et al. Expression of Bcl-2 and Bax in advanced or metastatic prostate carcinoma. **Urology journal**, v. 9, n. 1, p. 381-388, 2012.
- American Joint Committee for Cancer Staging. **Manual for Staging of Cancer**. Chicago, IL: American Joint Committee; 2018
- ARYA, V.; SINGH, S.; DANIEL, M. J. Clinicopathological correlation of Bcl-2 oncoprotein expression in oral precancer and cancer. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 1, p. 19–24, 2016.
- ATARBASHI, S., ELAHI, M., KHANI, M., & RAKHSHAN, V. Immunohistochemical analysis of B-cell lymphoma -2 in pleomorphic adenoma and mucoepidermoid carcinoma. **Dental Research Journal**, v. 11(2), p. 257–63, 2014.
- BARNES, Leon et al. (Ed.). **Pathology and genetics of head and neck tumours**. IARC, 2005.
- BLATT, S. et al. Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma: A review of the literature. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 5, p. 722–730, 2017.
- BORNER, C. The Bcl-2 protein family: Sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 11, p. 615–647, 2003.
- BRANDWEIN-GENSLER, M et al. Oral Squamous Cell Carcinoma : Histologic Risk Assessment, but Not Margin Status, Is Strongly Predictive of Local Disease-free and Overall Survival. **American Journal Of Surgical Pathology**, v. 29, n. 2, p. 167–178, 2005.
- BRENER, S. et al. Carcinoma de células escamosas bucal : uma revisão de literatura entre o perfil do paciente , estadiamento clínico e tratamento proposto. v. 53, n. 1, p. 63–69, 2007.
- BROCKLEHURST, P. R.; BAKER, S. R.; SPEIGHT, P. M. Oral cancer screening: what have we learnt and what is there still to achieve? **Future oncology (London, England)**, v. 6, n. 2, p. 299–304, 2010.
- BURLACU, A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 7, n. 3, p. 249–257, 2003.

CAMISASCA, D. R. et al. Expression of Bcl-2 family proteins and associated clinicopathologic factors predict survival outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 45, n. 3, p. 225–233, 2009.

CHAW, S. Y. et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers—E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin—in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. **Oral oncology**, v. 48, n. 10, p. 997-1006, 2012.

CHI, ANGELA C.; DAY, TERRY A.; NEVILLE, B. W. Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma — An Update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 5, p. 401–421, 2015.

CHIPUK, J. E. et al. The BCL-2 Family Reunion. **Molecular Cell**, v. 37, n. 3, p. 299–310, 2010.

COUTINHO-CAMILLO, C. M. et al. Expression of Bcl-2 family proteins and association with clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma. **Histopathology**, v. 57, n. 2, p. 304–316, 2010.

CZABOTAR, P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 49–63, 2014.

DE ABREU, P. M. et al. Frequency of HPV in oral cavity squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2018.

DEGLI ESPOSTI, D. et al. Unique DNA methylation signature in HPV-positive head and neck squamous cell carcinomas. **Genome Medicine**, v. 9, n. 1, p. 33, 2017.

DELBRIDGE, Alex RD et al. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. **Nature reviews Cancer**, v. 16, n. 2, p. 99, 2016.

DUAN, Y. et al. Hypoxia induced bcl-2/twist1 complex promotes tumor cell invasion in oral squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 7729–39, 2016.

Duray, A. et al. Immune suppression in head and neck cancers: a review. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2010, p. 1-15, 2010.

FARIA, M. H. G. et al. Expressão das proteínas BCL-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 4, p. 271–278, 2006.

FORASTIERE, Arlene et al. Head and neck cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 26, p. 1890-1900, 2001.

GLOBOCAN. **New Global Cancer Data: GLOBOCAN 2018**. Disponível em: <<https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018>>. Acesso em: 17 dez.

2018.

HELLIWELL, TIM; WOOLGAR, J. Dataset for histopathology reporting of mucosal malignancies of the oral cavity. **The Royal College of Pathologists**, v. G110, n. November 2013, p. 1–32, 2013.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2017.

TAN, Winson Jianhong et al. Prognostic significance of invasion depth in oral tongue squamous cell carcinoma. **ORL**, v. 74, n. 5, p. 264-270, 2012.

KFOURI, Suely Aparecida et al. Fraction of head and neck cancer attributable to tobacco and alcohol in cities of three Brazilian regions. **Rev. bras. epidemiol.**, São Paulo, v. 21, e180005, 2018.

KHAIRNAR, M. R.; WADGAVE, U.; KHAIRNAR, S. M. Effect of Alcoholism on Oral Health: A Review. **Journal of Alcoholism & Drug Dependence**, v. 05, n. 03, p. 3–6, 2017.

KIRKIN, V.; JOOS, S.; ZÖRNIG, M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1644, n. 2–3, p. 229–249, 2004.

KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncology**, v. 42, n. 10, p. 987–993, 2006.

LORO, L. L.; JOHANNESSEN, A. C.; VINTERMYR, O. K. Loss of BCL-2 in the progression of oral cancer is not attributable to mutations. **Journal of Clinical Pathology**, v. 58, n. 11, p. 1157–1162, 2005.

MONTERO, P. H.; PATEL, S. CANCER OF THE ORAL CAVITY. v. 24, n. 3, p. 491–508, 2016.

PAVITHRA, V. et al. Possible role of Bcl-2 expression in metastatic and non metastatic oral squamous cell carcinoma. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 9, p. ZC51-ZC54, 2017.

PEMBERTON, M. N. Oral cancer and tobacco: Developments in harm reduction. **British Dental Journal**, v. 225, n. 9, p. 1–5, 2018.


PETERSEN, P. E. Oral cancer prevention and control - The approach of the World Health Organization. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4–5, p. 454–460, 2009.

RIVERA, C. Essentials of oral cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 9, p. 11884–11894, 2015.

- RIVERA, C. et al. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review. **Oral Oncology**, v. 72, p. 38–47, 2017.
- RIVERA, C.; VENEGAS, B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**, v. 8, n. 1, p. 7–11, 2014.
- SASAHIRA, TOMONORI; KIRITA, T. Hallmarks of Cancer-Related Newly Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2413, p. 21, 2018.
- SINGH, B.B. et al. Immunohistochemical evaluation of Bcl-2 oncoprotein in oral dysplasia and carcinoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**. v. 85, n 6, p. 692–698, 1998.
- SHRIDHAR, K. et al. DNA methylation markers for oral pre-cancer progression: A critical review. **Oral Oncology**, v. 53, p. 1–9, 2016.
- SINEVICI, N.; O’SULLIVAN, J. Oral cancer : Deregulated molecular events and their use as biomarkers. **Oral Oncology**, v. 61, p. 12–18, 2016.
- TENI, T. et al. Expression of Bcl-2 and bax in chewing tobacco-induced oral cancers and oral lesions from India. **Pathology and Oncology Research**, v. 8, n. 2, p. 109–114, 2002.
- THOMAS, S. et al. Targeting the Bcl-2 Family for Cancer Therapy. **Expert opinion on therapeutic targets**. v. 17, n. 1, p. 61–75, 2014.
- UM, H.-D. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. **Oncotarget**, v. 7, n. 5, p. 5193–5203, 2016.
- VOGLER, M. Targeting BCL2-Proteins for the Treatment of Solid Tumours. **Advances in Medicine**, v. 2014, p. 1–14, 2014.
- XIONG, L. et al. BCL-2 inhibition impairs mitochondrial function and targets oral tongue squamous cell carcinoma. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, 2016.
- YIP, K. W.; REED, J. C. Bcl-2 family proteins and cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6398–6406, 2008.
- ZHANG, M. et al. Prognostic significance of Bcl-2 and Bax protein expression in the patients with oral squamous cell carcinoma. **Journal of oral pathology & medicine**. v.38, n.3 p. 307–313, 2009.
- ZYGOGIANNI, A. G. et al. Oral squamous cell cancer: Early detection and the role of alcohol and smoking. **Head and Neck Oncology**, v. 3, n. 1, p. 2, 2011.

9 APÊNDICES

APÊNDICE A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO À SAÚDE



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO À SAÚDE
Unimed Vitória

Vitória, 27 de junho de 2011.
Projeto No: **318/2011**
Parecer: 21/2011 ☐ Inicial ☒ Conclusão

Título: Estudo de Câncer de Cabeça e Pescoço no Brasil
Instituição: Hospital Santa Rita de Cássia
Pesquisador: José Roberto V de Podestá
Grupo e Área Temática Especial: IA

Prezado Pesquisador

Após o recebimento e apreciação do projeto e das respostas as pendências formuladas, seguem as observações deste Comitê:

1. Adequar os objetivos de acordo com hipóteses formuladas em linha com a justificativa do projeto.
Parecer do CEP: pendência atendida
2. Incluir, na metodologia os critérios de seleção (inclusão e exclusão) amostral assim como características outras que sejam pertinentes. Explicitar, ainda na metodologia, o estudo piloto, e sua metodologia.
Parecer do CEP: Pendência atendida. O estudo piloto não foi contemplado na metodologia, mas é citado na página 17.
3. Justificar ausência do cálculo amostral
Parecer do CEP: Pendência atendida. É citado na página 10 (metodologia) que a amostra será de conveniência.
4. Adequar o TCLE à CNS 347/05 de Janeiro 2005 e incluir campos para identificação de quem aplicou o TCLE. É direito inalienável do sujeito de pesquisa saber ou não querer saber sobre seus resultados de exames realizados em sua propriedade biológica, tenha ou não aplicabilidade clínica. Pede-se, portanto, para rever a informação sobre o tema no TCLE.
Parecer do CEP: pendência atendida. TCLE devidamente adequado e, sobe nossa avaliação, dentro dos critérios éticos e alinhados com a resolução 196/1996 e suas complementares.

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CIAS Unimed Vitória
Av. Leito da Silva, 2311, Bairro Itararé Vitória (ES) CEP: 29047.575 – 27 3335-5348 cep@unimedvx.com.br

Página 1 de 2



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO À SAÚDE
Unimed Vitória

5. Corrigir o cronograma

Parecer do CEP: pendência atendida. Cronograma corrigido.

6. Incluir Declarações de Infraestrutura de todas as instituições hospitalares participantes, inclusive a do Hospital que assina a Folha de Rosto.

Parecer do CEP: pendência atendida. Declarações entregues.

7. Informar no dossiê se as amostras biológicas permanecerão identificadas e no país ou se serão exportadas e/ou desvinculadas dos respectivos sujeitos.

Parecer do CEP: pendência atendida

CONCLUSÃO

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa acima citado, foi considerado:

APROVADO

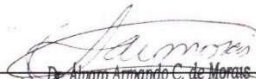
É parecer desse comitê que o referido projeto e demais documentos apresentados, **atende** aos aspectos da Resolução **CNS 196/96** e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Estamos aguardando o parecer final da CONEP.

Foram aprovados os seguintes documentos:

- Projeto de pesquisa versão de 1º de abril de 2011;
- Declaração de infraestrutura versão 27 de abril de 2011;
- Respostas as pendências versão 27 de abril de 2011;

O primeiro relatório de andamento do projeto deverá ser encaminhado a este CEP até o dia 27 de dezembro de 2011.

Atenciosamente,


Dr. Alvaro Amador C. de Moraes
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do CIAS

APÊNDICE B – PARECER DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE DA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER N°. 681/2011

Registro CONEP 16525 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – Não há CAAE ou nº de Folha de Rosto **Processo nº** 25000.098091/2011-05
Projeto de Pesquisa: *"Estudo de Câncer de cabeça e pescoço no Brasil"*. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de 10/04/2011.

Pesquisador Responsável: José Carlos de Oliveira

Instituição: ACCG/Instituto Ensino e Pesquisa/Hospital Araújo Jorge (1º CENTRO BRASILEIRO)

CEP de origem: CEP - ACCG - Instituto de Ensino e Pesquisa/GO

Área Temática Especial: Genética humana

Patrocinador: Não informado.

Sumário geral do protocolo

O câncer de cabeça e pescoço compreende um grupo de neoplasias que surgem na cavidade oral, faringe e laringe. É o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo, representando cerca de 6% dos casos de câncer. Em todo o mundo, mais de 500.000 novos casos e 300.000 óbitos por câncer de cabeça e pescoço são estimados para ocorrer a cada ano. Este meio milhão de casos inclui 262.700 cânceres da cavidade oral, 117.200 cânceres de faringe e 169.600 cânceres da laringe. As taxas de incidência padronizadas são 15,3 e 4,5 por 100.000 homens e mulheres, respectivamente. As taxas de incidência no Brasil são cerca de 22,1/100.000 e 3,3/100.000 para homens e mulheres, respectivamente.

O tratamento primário varia de acordo com a localização anatômica e estágio da doença. Para a maioria dos tipos de câncer diagnosticados em estádios iniciais, a ressecção cirúrgica é a principal modalidade de tratamento. No entanto, para certos sítios anatômicos, como as amígdalas, a base da língua e o assoalho da boca, bem como para todos os cânceres localmente avançados, radioterapia é usada, isolada ou combinada com cirurgia. A quimioterapia pode ser utilizada em associação com a radioterapia. No entanto, no Brasil, a taxa de sobrevida em 5 anos ainda é inferior a 50%.

Publicações recentes sugerem um papel para infecção por HPV na sobrevida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (ver abaixo seção sobre HPV). Os Polimorfismos genéticos nos genes de reparo do DNA, os genes do ciclo celular, o metabolismo carcinogênico, e vias de genes do fator de crescimento foram analisados em relação à progressão e sobrevida de pacientes com câncer de vias aerodigestivas superiores (VADS). Polimorfismos nos genes XRCC1, FGFR e CCND1 foram associados com a sobrevida em pacientes com cânceres das VADS em pelo menos 2 estudos. No entanto, Hopkins *et al* criticou que esses estudos eram pequenos (<300 casos), muitas vezes tinham descrições inadequadas da população em estudo, não consideraram as comparações múltiplas de forma apropriada e podiam estar sujeitos a viés de publicação. Assim, não existem no momento estudos de seguimento de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, que permitam a avaliação simultânea do papel do fumo, álcool, HPV, genética e tratamento

Cont. Parecer CONEP nº. 681/2011

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

OBS: No Brasil, além do centro em tela, está prevista a participação dos seguintes centros: Hospital do Câncer de Barretos/SP (Dr. André Lopes Carvalho/CEP do Hospital Câncer Barretos); Hospital Erasto Gaertner/PR (Dr. Gyl Henrique Albrecht Ramos e Dra. Paola Pedruzzi/CEP do Hospital Erasto Gaertner); Hospital A C Camargo/SP (Dr. Luiz Paulo Kowalski e Dr. Mauro Kasuo Ikeda/CEP do Hospital do Câncer - A C Camargo/SP); Associação de Combate ao Câncer em Goiás/Hospital Araújo Jorge/GO (Dr. José Carlos de Oliveira e Drª. Maria Paula Curado/Comitê de Ética do Hospital Araújo); Departamento de Otorrinolaringologia UFGO Goiânia/GO (Dr. Claudinei Cândido Costa/CEP do HC da UFG); Faculdade de Medicina do ABC/SP (Dra. Jossi Ledo Kanda/CEP NÃO INFORMADO); Liga Norte-Rio-Grandense Contra o Câncer/RN (Dr. Ricardo José Curioso da Silva e Dr. Luis Eduardo Barbalho de Melo /CEP da Liga Norte-Rio-Grandense Contra o Câncer); Instituto do Câncer do Ceará/CE (Dr. Eric Fernandes de Souza/CEP NÃO INFORMADO); FCECON - Fundação Centro Controle de Oncologia/AM (Dr. Marco Antonio Cruz Rocha e Dr. Jeferson Moreira de Medeiros/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Heliópolis/SP (Dr. Carlos Neutzling Lehn/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Santa Rita/AFECC - Associação Feminina de Educação e Combate ao Câncer/ES (Dr. Jose Roberto Vasconcelos de Podesta/Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS); Pontifícia Universidade Católica de Campinas/SP (Dr. José Francisco de Sales Chagas e Dr. Maria Beatriz Nogueira Pascoal/CEP da PUC Campinas); Hospital Universitário/UnB (Dr. Luiz Augusto Nascimento e Dr. Juliano de Padua Nakashima/Comitê de ética em Pesquisa - Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde); Instituto Nacional do Câncer – INCA/RJ (Dr. Fernando Luiz Dias, Dr. Roberto Araujo Lima e Dra. Isabella Costa Santos/Comitê de Ética e Pesquisa do INCA); Instituto Brasileiro de Controle do Câncer/SP (Dra. Adriana Sonderman, Dr. André Bandiera de Oliveira Santos e Dr. Fabio Roberto Pinto/CEP do BCC - Instituto Brasileiro de Controle do Câncer); Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP/SP (Dr. Lenine Garcia Brandão/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Amaral Carvalho FUNDAÇÃO AMARAL CARVALHO/SP (José Getulio Segalla/Comitê de Ética em Pesquisa Fundação Hospital Amaral Carvalho) e Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP/SP (Prof. Dr. Marcos B. Paiva/Comitê de Ética em Pesquisa).

Caso ocorra modificação nessa informação, o CEP do 1º Centro deve ser informado para comunicação à CONEP. O CEP deve enviar cópia dessa comunicação para o pesquisador responsável do seu Centro. Ressalta-se que os centros que não possuem Comitês de Ética em Pesquisa - CEP, devem solicitar a CONEP a indicação de um CEP para a análise do projeto.

NOTA: Caso na execução do protocolo, em um determinado Centro, haja parceria de instituições no recrutamento e/ou atendimento de sujeitos de pesquisa, solicita-se ao CEP correspondente que observe cuidadosamente os seguintes aspectos, conforme exigências éticas explicitadas nos itens III.3.i, V.5, VI.2.h, VI.2.i, VI.3.d e VI.3.g da Resolução CNS 196/96 e item IV.1.m da Resolução CNS nº 251/97, com vistas à garantia da assistência ao sujeito da pesquisa, sem prejuízo ao Sistema Único de Saúde:

1) formas de recrutamento e referência de sujeitos de pesquisa; se serão pacientes do SUS e ou/ particulares; em que instituição estão registrados, ou seja, qual instituição assume as responsabilidades inerentes à "Instituição de Pesquisa";

2) descrição da infra-estrutura disponível para a realização da pesquisa;

3) vínculos do pesquisador;

4) anuência assinada pela diretoria técnica de instituições parceiras, para assistência dos sujeitos de pesquisa, quando for o caso, com apresentação de convênios ou outras relações envolvendo pessoas jurídicas;

Ressalta-se que, havendo envolvimento do SUS em parcerias com instituições privadas, a avaliação desse aspecto extrapola as atribuições do Sistema CEPs-CONEP, devendo o pesquisador e o responsável pela instituição buscar a manifestação do Poder Público Correlato (estadual ou municipal), por meio da respectiva Assessoria Jurídica, em cumprimento à Lei Orgânica da Saúde 8080/91.

Brasília, 25 de outubro de 2011.

APÊNDICE C – PARECER DO NATIONAL RESEARCH ETHICS SERVICE



National Research Ethics Service

Coventry Research Ethics Committee

2nd floor West Wing
University Hospital
Clifford Bridge Road
Coventry
CV2 2DX

24 February 2010

Telephone: 024 7696 7529
Facsimile: 024 7696 5033

Professor Hisham Mehanna
Institute of Head & Neck Studies & Education
University Hospital
3rd floor opposite Ward 32
Clifford Bridge Road
Coventry CV2 2DX

Dear Professor Mehanna

Study Title: Improving treatment selection using Predictive Classifiers of Treatment Response for Head and Neck Cancers and dysplasia.
REC reference number: 10/H1210/9
Protocol number: Version 1.0

The Research Ethics Committee reviewed the above application at the meeting held on 16 February 2010. Thank you for attending to discuss the study.

Ethical opinion

You advised the Committee you were aiming to develop treatment response classification to help predict response to treatment for two types of patients; first patients who have laryngeal voice box or mouth and throat cancer; second patients with laryngeal and mouth dysplasia. Through using the formula you would be able to predict whether a patient with cancer with these characteristics would be best receiving surgery rather than chemotherapy similarly whether patients with oral dysplasia would better respond to surgery rather than a 'wait and see' approach thus individualising treatment for those patients. By linking a series of chemotherapy and genetic tests on the samples and responses to treatment in relevant cohort of patients you have target diseases or cancers by correlating biomarkers. This was a well known protocol for developing biomarkers and classifications in UK, i.e. biomarker road map.

According to the pilot study out of 100 patients 80 could not now be traced so the Committee wanted to know how you would know how the patients had progressed if you could not contact 80%. You explained that patients had been treated and biopsied in the local hospital then followed up, some died some didn't and you would follow up the local ones. You would ask the local team for patients' tissue and pseudo anonymised outcome data; i.e. link anonymised you had no way of tracking the code.

The local centres were responsible for consenting patients via the operating consent form so the Committee wondered if there was a possibility of tissue from someone who did not consent being included in the study. You stated that where there was agreement they would be included but before September 2006 patients' samples could be used without their express consent provided they were anonymised. Under

This Research Ethics Committee is an advisory committee to West Midlands Strategic Health Authority

The National Research Ethics Service (NRES) represents the NRES Directorate within the National Patient Safety Agency and Research Ethics Committees in England

Statement of compliance

The Committee is constituted in accordance with the Governance Arrangements for Research Ethics Committees (July 2001) and complies fully with the Standard Operating Procedures for Research Ethics Committees in the UK.

After ethical review

Now that you have completed the application process please visit the National Research Ethics Service website > After Review

You are invited to give your view of the service that you have received from the National Research Ethics Service and the application procedure. If you wish to make your views known please use the feedback form available on the website.

The attached document "After ethical review – guidance for researchers" gives detailed guidance on reporting requirements for studies with a favourable opinion, including:

- Notifying substantial amendments
- Adding new sites and investigators
- Progress and safety reports
- Notifying the end of the study

The NRES website also provides guidance on these topics, which is updated in the light of changes in reporting requirements or procedures.

We would also like to inform you that we consult regularly with stakeholders to improve our service. If you would like to join our Reference Group please email referencegroup@nres.npsa.nhs.uk.

10/H1210/9

Please quote this number on all correspondence

With the Committee's best wishes for the success of this project

Yours sincerely



Mr Stephen Keay
Chairman

Email: pauline.pittaway@uhcw.nhs.uk

Enclosures: List of names and professions of members who were present at the meeting and those who submitted written comments

"After ethical review – guidance for researchers SL-AR2

Copy to: Mrs Ceri Jones, R&D, UHC&W NHS Trust

APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO INICIAL SOBRE HÁBITOS E ESTILO DE VIDA

ID No. BR VIX -

ESTUDO INTERNACIONAL SOBRE CÂNCER DE BOCA, FARINGE E LARINGE ANEXO 1A

Questionário Inicial sobre Hábitos e Estilo de Vida

- A1 Status
(1) Caso; (2) Controle
- Prontuário médico No (MV)..... Médico.....
- A3 Hospital
- A4 Entrevistador
- A5 Data da entrevista
Dia Mês Ano
- A6 Nome Paciente:
- A7 RG:.....
- A8 Endereço:
- A9 Telefone fixo:..... Telefones adicionais:.....
- A10 Nome da mãe:
- A11 Qual a sua data de nascimento?
Dia Mês Ano
- A12 Sexo
(1) Masculino (2) Feminino
- A13 Qual a sua idade?
- A14 Qual a sua raça (cor da pele)?
(1) Branco (2) Negro (3) Pardo ou Mulato (4) Amarelo (Asiático) (5) Indígena
- A15 Em que Município ou distrito você mora?
- A15 Em que Estado você mora?
- A16 Há quantos anos você vive nesse lugar?
(se há menos de um ano, codifique como 00)
- A17 Se você mora nesse lugar há menos de um ano, em que Município você morava antes?
- A19 Qual o seu grau de escolaridade?
(0) Analfabeto
(1) Ensino Fundamental Incompleto
(2) Ensino Fundamental Completo (concluiu a 8ª série)
(3) Ensino Médio Completo (concluiu o 3º colegial)
(4) Ensino Superior Completo
- A20 Você já teve diagnóstico de câncer no passado?
(1) Sim (2) Não
- Se Sim. Qual foi o tipo de câncer (o local principal)?
- Aproximadamente, quando foi diagnosticado o câncer anterior?
Mês Ano

ID No. BR VIX - **HÁBITO DE FUMAR**

- B1 Você fuma ou já fumou em média um cigarro/cachimbo regularmente, durante pelo menos 1 ano?
 (1) Sim, ainda (2) Somente no passado (3) Não, nunca [se 'Não, nunca', vá para a questão C]

Se Sim ou somente no passado,

- B2 Normalmente, quantos cigarros/por dia, você fuma ou fumava?
 B3 Idade em que começou a fumar (isto é, fumando na maioria dos dias)

Somente para ex-fumantes

- B4 Idade em que parou de fumar
 B5 Você parou de fumar porque estava doente?
 (1) Sim (2) Não

CONSUMO DE BEBIDAS

- C1 Você ingere ou já ingeriu bebidas alcoólicas regularmente, durante pelo menos 1 ano?
 (1) Sim, ainda (2) Somente no passado (3) Não, nunca [se 'Não, nunca', vá para a questão D]
 C2 Quantas vezes por semana você consome ou consumia bebidas alcoólicas?
 0 - 7 (0 significa nenhuma vez na maioria das semanas)

Para as pessoas que consomem bebidas alcoólicas atualmente ou já consumiram no passado.
 O quanto normalmente você bebe ou costumava beber em uma semana?

Nota: Se o entrevistado responder em um intervalo (exemplo: de 2 a 3 garrafas), usar a maior quantidade (exemplo: 3 garrafas)

- C3 Cachaça ou outros destilados (vodca, uísque, tequila, rum, gim)
 doses/semana ou garrafas/semana
 C4 Vinho
 taças/semana ou garrafas/semana
 C5 Cerveja
 latas/semana ou garrafas/semana
 C6 Há quantos anos parou de beber?
 C7 Você parou de beber porque estava doente?
 (1) Sim (2) Não

ID No. BR VIX - |_|_|_|_|

SAÚDE BUCAL

- D1 Com qual frequência você escova seus dentes? |_|
- (0) Nunca
 (1) < uma vez por semana (5) 2 vezes/dia
 (2) 1-2 vezes por semana (6) 3 vezes/dia
 (3) Dia sim, dia não (7) > 3 vezes/dia
 (4) Uma vez por dia (8) Edêntulo (não tem dentes)

- D2 Você usa próteses removíveis ("dentadura", "ponte móvel")? |_|
- (1) Sim, prótese total (dentadura) (2) Sim, prótese parcial (2) Não

Se sim:

- D4 Com qual idade você começou a usar próteses removíveis? |_|_|

- D5 Nos últimos 20 anos, com qual frequência você foi ao dentista? |_|
- (1) Todos os anos (3) A cada 5 anos ou mais
 (2) A cada 2-5 anos (4) Nunca

- D6 Recebeu orientação do Dentista de como tratar a saúde bucal? |_|
- (1) Sim (2) Não

- D7* Recebeu tratamento odontológico do SUS ou da Rede Privada? |_|
- (1) SUS (2) Privado

- D8* Você percebeu alguma lesão na cavidade bucal? |_|
- (1) Sim (2) Não

Se sim:

- D9 Há quanto tempo percebeu sinais e sintomas? (em meses) |_|_|

APÊNDICE E – FORMULÁRIO DE DADOS CLÍNICOS

ID No. BR VIX - | | | | |

ANEXO 1B (Somente para os casos) FORMULÁRIO DE DADOS CLÍNICOS

Orientações: Somente para Primeira Consulta. Este formulário deverá ser preenchido pelo médico.

B1- Tratamento secundário será preenchido nos formulários de acompanhamento.

B2 - Data do preenchimento

| | | | | - | | | | | - | | | | |
Dia Mês Ano

Nome Paciente: _____

1. Dados de Referência, quando apropriado (DD/MM/AAAA):

- B3 - Biópsia | | | | | / | | | | | / | | | | |
- B4 - Diagnóstico clínico (consulta na oncologia) | | | | | / | | | | | / | | | | |
- B5- Diagnóstico patológico (laudo histopatológico) | | | | | / | | | | | / | | | | |

2. DADOS PATOLÓGICOS

B6- Nome laboratório de Patologia B7 - Laudo nº

B8 - Categoria do tipo histológico:

(1) Carcinoma epidermóide (2) Adenocarcinoma (3) Carcinoma in situ (displasia de alto grau)

(3) Outro (especificar):

B9 - Conclusão do laudo histopatológico (copiar conclusão completa)

.....

3. FORMULÁRIO DE ESTADIAMENTO (classificação TNM, 7ª edição):

B10 - Sítio primário do tumor (topografia), segundo a CID-O3, 2000¹:

C | | | | | . | | |

B11 – Sítio primário do tumor

(1) Lábio (2) Cavidade oral (3) Orofaringe (4) Hipofaringe (5) Laringe

| |

B12 - Lateralidade do tumor: (1) Esquerda (2) Direita (3) Bilateral

| |

B13 -Tumor multifocal: (1) Sim (2) Não

| |

B14 - Diâmetro máximo, maior ou único do tumor em centímetros:

| | | | |

Estadiamento clínico

B15 T | | | | |

B16 N | | | | |

B17 M | | | | | B18 - Se M1, sítio(s) de metástase: | | | | |

B19 Estadio | | | | |

TRATAMENTO PROPOSTO

| |

(1) Cirurgia (2) Radioterapia (3) Quimioterapia (4) Cirurgia + Radioterapia (5) Cirurgia + Quimioterapia (6) Radioterapia + Quimioterapia (7) Cirurgia + Radioterapia + Quimioterapia

APÊNDICE F – FORMULÁRIO DE ACOMPANHAMENTO CLÍNICO

ID No. BR VIX - |_|_|_|_|_|

ANEXO 4 (somente para os casos) FORMULÁRIO DE ACOMPANHAMENTO CLÍNICO

ID No. INT-|_|_|-|_|_|_|_|_|

Momento de acompanhamento para o resultado:

|_|

- (1) 1ª visita de acompanhamento (F1)
- (2) 2ª visita de acompanhamento (F2):
- (3) 30 meses de acompanhamento
- (4) 60 meses de acompanhamento
- (5) Situação médica identificada em outro contexto
(Especificar: :)

Formulário preenchido em (DD/MM/AAAA): |_|_|/|_|_|/|_|_|_|_|, por (Nome):

Dia Mês Ano

Fonte da informação (marque todas que se aplicam):

|_|

- (1) Registro de Mortalidade e câncer
- (2) Declaração de óbito
- (3) Contato com o paciente ou familiares do paciente
- (4) Consulta médica
- (5) Prontuários médicos
- (6) Outros, especificar:

Estado vital:

|_|

- (1) Vivo (2) Óbito (3) Perdido seguimento

Se Vivo:

Progressão do tumor:

|_|

- (1) Em remissão completa (2) Doença residual (3) Doença Sistêmica (metástase em outro órgão)
- (4) Recidiva (5) Segundo tumor primário CID |_____|

Se recidiva: (1) Local (2) Regional

|_|

Data da recidiva

____/____/____

Se óbito, causa do óbito:

Causa primária do óbito: código CID-10:

|_|_|_|_|

Caso o CID não esteja disponível selecione uma das seguintes opções:

|_|

- (1) Câncer de cabeça e pescoço
- (2) Outro câncer
- (3) Toxicidade do tratamento usado para câncer de cabeça e pescoço
- (4) Outros, especificar:
- (5) Desconhecido

Data de óbito

____/____/____

Se perdido seguimento:

Última data conhecida por estar vivo (em caso de perdido de seguimento)

____/____/____

Para todos os pacientes, tratamentos adicionais (segunda linha) após o tratamento inicial:☐

Tratamento (assinale todos que se aplicam)	Data de início (dd/mm/aaaa)	Data de término (dd/mm/aaaa)
(1) Cirurgia		N/A
(2) Radioterapia		
(3) Quimioterapia		
(4) Cirurgia + Radioterapia		
(5) Cirurgia + Quimioterapia		
(6) Radioterapia + Quimioterapia		
(7) Cirurgia + Quimioterapia + Radioterapia		

Informações/comentários adicionais:

--